

Université de Montréal

Interaction de Tau avec la petite GTPase Rab5

par
Grégoire MORISSE

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de maître ès science
en Pathologie et Biologie Cellulaire
option système nerveux

Juillet, 2009

© Grégoire MORISSE, 2009

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Interaction de Tau avec la petite GTPase Rab5

présenté par :

Grégoire MORISSE

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Roger LIPPE
Président-rapporteur

Nicole LECLERC
Directeur de recherche

Karl FERNANDES
Membre du jury

RÉSUMÉ

La protéine Tau joue un rôle essentiel dans les neurones, notamment par ses interactions avec les éléments du cytosquelette. Des études récentes ont également montré que Tau était impliquée dans la motilité des organelles le long des microtubules axonaux.

Dans ce mémoire de Maîtrise, nous avons démontré par recouvrement sur gel une nouvelle interaction *in vitro* pour Tau avec la petite GTPase Rab5, qui est impliquée dans l'endocytose précoce. De plus, nous avons montré que Tau et Rab5 immuno-précipitaient sur une même population de vésicules *in vivo*. La sur-expression de Tau dans des neurones primaires de l'hippocampe nous a permis de montrer que Tau et Rab5 avaient une distribution similaire dans l'axone des neurones, suggérant un rôle de Tau dans l'ancrage des endosomes précoces sur les microtubules. Par contre, à la différence de ce qui a pu être observé dans certaines études, la sur-expression de Tau n'a pas inhibé le transport axonal des endosomes précoces. Enfin, nous avons montré que Tau interagissait préférentiellement avec la Rab5 active liée au GTP et des résultats préliminaires nous laissent penser que Tau serait un effecteur ou une GAP pour Rab5.

Dans les tauopathies, la Tau devient hyperphosphorylée, décroche des microtubules axonaux et forme des agrégats dans le corps cellulaire du neurone. Ces modifications biochimiques et de localisation de la protéine Tau pourraient être la source d'une perte d'interaction de la Tau avec Rab5 et être responsable de certaines atteintes neurologiques observées dans les tauopathies.

Mots clés : Tau, Rab5, endosomes précoces, axone, ancrage, microtubules, GAP

SUMMARY

Tau protein plays an essential role in neurons, in particular in its interactions with cytoskeletal elements. Recent studies have shown that Tau was also regulating organelles motility along axonal microtubules.

In this work, using far-western blot, we have shown a new *in vitro* interaction for Tau with the small GTPase Rab5, a protein implicated in early endocytosis. Furthermore, we have shown that Tau and Rab5 were immuno-precipitated on a same pool of vesicles *in vivo*. Over-expression of Tau in primary hippocampal neurons have shown that Tau and Rab5 have a similar distribution in axons, suggesting that Tau plays a role as an anchor protein for early endosomes onto microtubules. In contrast to what has been shown earlier in other studies, Tau did not blocked axonal transport of early endosomes. Finally, we have shown that Tau was interacting preferentially with the active form of Rab5 bound to GTP and preliminary results suggest that Tau would be an effector or a GAP for Rab5.

In tauopathies, Tau become hyperphosphorylated, loose its affinity with axonal microtubules and form aggregates in the cell body of the neuron. This biochemical modifications and relocalisation of Tau protein might be responsible for a loss of interaction between Tau and Rab5 and consequently of some of the neuropathological symptoms observed in tauopathies.

Keywords: Tau, Rab5, early endosomes, axon, anchor, motility, GAP

SOMMAIRE

RÉSUMÉ	III
SUMMARY	IV
SOMMAIRE	V
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
REMERCIEMENTS	XII
1. INTRODUCTION	1
1.1. Le Neurone.....	1
1.1.1. Le système nerveux central	1
1.1.2. Le cytosquelette neuronal.....	2
1.1.2.1. Les microtubules.....	2
1.1.2.2. Les neurofilaments et les microfilaments d'actine.....	2
1.1.3. La polarité neuronale.....	3
1.1.4. Le transport axonal.....	4
1.2. La protéine Tau.....	8
1.2.1. Structure de Tau	8
1.2.2. Localisation de Tau	14
1.2.3. Rôles de Tau.....	14
1.2.3.1. Formation de l'axone.....	14
1.2.3.2. Régulation de la structure de l'axone.....	15
1.2.3.3. Motilité des organelles dans l'axone.....	16
1.2.3.4. Signalisation cellulaire.....	17
1.2.4. Phosphorylation de Tau.....	18
1.2.4.1. Rôle physiologique de la phosphorylation.....	18
1.2.4.2. L'hyperphosphorylation de Tau, forme pathologique	19
1.2.5. Tau et Neuropathologie	20
1.2.5.1. Les tauopathies	20
1.2.5.2. Mutations de Tau et neurodégénérescence	21
1.2.5.3. Modèles animaux.....	21

1.3. L'endocytose et les Rab-GTPases	22
1.3.1. Mécanisme de l'endocytose.....	22
1.3.1.1. Voies d'internalisation.....	22
1.3.1.1.1. Endocytose clathrine-dépendante.....	22
1.3.1.1.2. Endocytose Caveoline-dépendante	26
1.3.1.2. Dégradation ou recyclage des composés internalisés	26
1.3.2. Les Rab-GTPases	27
1.3.2.1. Fonction et régulation	27
1.3.2.2. Modifications post-traductionnelle par les lipides	28
1.3.2.3. Cycle des Rabs.....	28
1.3.2.3.1. La REP et la RabGDI.....	29
1.3.2.3.2. Les GEFs et les GAPs.....	30
1.4. La protéine Rab5.....	33
1.4.1. Éléments de structure	33
1.4.2. Rôles de Rab5	34
1.4.2.1. Endocytose clathrine dépendante.....	34
1.4.2.2. Activation de Rab5 et recrutement d'effecteurs	34
1.4.2.3. Création de micro-domaines enrichis en Rab5 active et évènements de fusion.....	38
1.4.2.4. Inactivation de Rab5	39
1.4.2.5. Rab5 régule l'interaction et la motilité des endosomes précoces sur les microtubules.....	40
1.4.3. Rab5 dans les neurones.....	40
1.4.3.1. Rab5 et la voie de signalisation des neurotrophines	40
1.4.3.2. Régulation de la taille des vésicules synaptiques.....	41
1.4.3.3. Phénomènes de LTP et de LTD.....	42
1.4.4. Rab5 un nouvel interacteur pour Tau ?.....	43
 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	 44
2.1. Plasmides.....	44
2.2. Production et purification de protéines.....	45
2.3. Recouvrement sur gel.....	46
2.4. Immuno-isolation	48
2.5. Immuno-buvardage.....	49
2.6. Culture de neurones d'hippocampe de rat.....	50
2.7. Microscopie confocale et à fluorescence	51
2.8. Interaction GDP/GTP γ S et activité GAP	52
2.9. Modèle de souris transgéniques (JNPL3).....	53

3. RÉSULTATS	54
3.1. Un nouvel interacteur pour Tau, la Rab5a ?	54
3.2. Interaction de Rab5a avec la partie C-terminale de Tau <i>in vitro</i>	60
3.2.1. Confirmation de l'interaction de Tau-CT et Rab5a	60
3.2.2. Détermination de la zone d'interaction.....	60
3.2.3. Mutants ponctuels des démences fronto-temporales	61
3.3. Interaction spécifique de Tau avec Rab5	64
3.3.1. Interaction de Tau avec Rab5a et Rab5b <i>in vitro</i>	64
3.3.2. Absence d'interaction de Tau avec Rab4 et Rab6	64
3.4. Co-localisation de Tau et Rab5 sur une même population de vésicules	68
3.4.1. Immuno-isolation à partir d'un homogénat de cerveau	68
3.4.2. Immuno-isolation à partir d'une fraction enrichie en endosomes Rab5-positifs neuronaux.....	69
3.4.3. Localisation de Tau et Rab5 dans les neurones	70
3.5. Effet de la sur-expression de Tau sur Rab5 <i>in vivo</i>	75
3.5.1. Sur-expression de Tau dans des neurones primaires de l'hippocampe.....	75
3.5.1.1. Méthodologie employée	75
3.5.1.2. Distribution des structures Rab5-positives dans l'axone	76
3.5.1.3. Quantification des structures Rab5-positives dans l'axone.....	76
3.5.1.4. Distribution de la surface fluorescente pour la Rab5-mRFP dans l'axone	77
3.5.2. Sur-expression de la Tau P301L chez des souris JNPL3.....	82
3.6. Interaction préférentielle de Tau avec la Rab5 liée au GTP.....	85
3.7. Détection de l'effet GAP de Tau envers Rab5	88
4. DISCUSSION.....	91
4.1. Résumé des résultats	91
4.2. Détection d'un nouvel interacteur pour Tau : la petite GTPase Rab5	93
4.2.1. Interaction directe de Tau et Rab5 <i>in vitro</i>	93
4.2.1.1. Recherche d'un nouvel interacteur pour Tau	93
4.2.1.2. Confirmation de l'interaction entre Tau et Rab5	94
4.2.2. Co-localisation de Tau et Rab5 <i>in vivo</i>	96
4.2.2.1. Immuno-isolation de membranes contenant Tau et Rab5.....	96
4.2.2.2. Localisation de Tau et Rab5 dans les neurones de l'hippocampe.....	96
4.2.3. Interaction <i>in vitro</i> de Rab5 avec la région de Tau qui se lie aux MTs	97
4.3. Ancrage des endosomes précoces sur les MTs par l'action de la protéine Tau	99

4.3.1. Régulation de l'interaction des endosomes précoces sur les MTs axonaux par la protéine Tau	99
4.3.1.1. Exemples de protéines régulant l'interaction entre des organelles et les éléments du cytosquelette	99
4.3.1.2. Distributions similaires des protéines Tau et Rab5 dans l'axone des neurones primaires de l'hippocampe	100
4.3.1.3. Quantification des endosomes précoces dans les axones sur-exprimant la Tau	101
4.3.2. Ancrage des endosomes précoces sur les MTs axonaux par l'action de Tau sur les moteurs kinésine et dynéine	103
4.3.2.1. Régulation des moteurs kinésine et dynéine par la Tau	103
4.3.2.2. Effet de la sur-expression de Tau sur le transport axonal dans les neurones primaires de l'hippocampe	104
4.4. Rôle de Tau dans le cycle GTP/GDP de Rab5	106
4.4.1. Interaction préférentielle de Tau avec la Rab5-GTP	106
4.4.2. Tau, un effecteur ou une GAP pour Rab5 ?	107
4.4.2.1. Mesure de l'effet GAP	107
4.4.2.2. Comparaison de Tau avec d'autres GAPs pour Rab5	108
4.4.2.3. Tau, une séquence de ciblage des endosomes précoces vers les microtubules ?	109
4.4.2.4. Influence de l'effet GAP de Tau sur la motilité des endosomes précoces	109
4.5. Implication de l'interaction et de l'effet GAP de Tau envers Rab5 dans les neuropathologies	114
4.5.1. Déficits de l'endocytose dans les neuropathologies	114
4.5.2. Déficits de l'endocytose dans la maladie d'Alzheimer	115
4.5.3. Est-ce que l'interaction de Tau avec Rab5 pourrait être altérée en condition pathologique ?	116
4.5.4. Cas de la démence fronto-temporale FTDP-17	118
4.5.5. Identification de la voie d'endocytose régulée par Tau	119
4.6. Conclusions	120
 5. BIBLIOGRAPHIE	 121

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : le cytosquelette et les moteurs neuronaux	6
Figure 2 : représentation des différentes isoformes de la protéine Tau humaine du SNC générées par épissage alternatif.....	10
Figure 3 : domaines de la protéine Tau.....	12
Figure 4 : schéma de la voie d'endocytose et aperçu de quelques protéines régulatrices. .	24
Figure 5 : le cycle des Rab-GTPases et leurs interacteurs.	31
Figure 6 : micro-domaines de Rab5 activée.....	36
Figure 7 : schéma des mutants de délétion de Tau	56
Figure 8 : la petite GTPase Rab5a, un nouvel interacteur pour Tau ?	58
Figure 9 : interaction de Tau et de mutants de Tau avec Rab5a <i>in vitro</i> en recouvrement sur gel.....	62
Figure 10 : interaction spécifique de Tau avec Rab5a et Rab5b <i>in vitro</i> en recouvrement sur gel.....	66
Figure 11 : co-localisation de Tau et Rab5 sur une même population de vésicules <i>in vivo</i>	71
Figure 12 : localisation de Tau et Rab5 <i>in vivo</i> dans des neurones primaires de l'hippocampe.....	73
Figure 13 : sur-expression de Tau dans des neurones primaires de l'hippocampe.....	78
Figure 14 : analyse quantitative de la sur-expression de Tau sur la distribution des structures Rab5-positives dans des neurones primaires de l'hippocampe	80
Figure 15 : augmentation du niveau de Rab5 <i>in vivo</i> chez les souris sur-exprimant la Tau- P301L humaine	83
Figure 16 : interaction préférentielle de Tau avec Rab5-GTP	86
Figure 17 : mesure de l'activité GAP de Tau sur Rab5	89

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AP-2 : protéine adaptatrice 2

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine tri-phosphate

BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau

BH : *BCR homology*

CCV : vésicule à clathrine

CCP : puits à clathrine

CPE : Carboxypeptidase E

FTDP-17 : démence fronto-temporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17

GAP : *GTPase activating protein*

GEF : *guanosine exchange factor*

GDP : guanosine di-phosphate

GTP : guanosine tri-phosphate

GTPase : guanosine tri-phosphatase

Htt : huntingtin

KO : *knock-out*

MAP : protéine associée aux microtubules

MTs : microtubules

NFs : neurofilaments

NGF : facteur de croissance neuronal

NFTs : agrégats neuro-fibrillaires

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

PHFs : filaments pairés hélicaux

RabGDI : *Rab-GDP Dissociation Inhibitor*

RabGGTase : Rab géranylgéranyl transférase

RE : réticulum endoplasmique

REP : protéine d'escorte des Rabs

SNC : système nerveux central

TBC : Tre-2, Bub2 et Cdc16

TGN : réseau trans-golgi

TLC : chromatographie sur couche mince

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les personnes suivantes :

- Le Dr Nicole Leclerc, ma directrice de recherche, pour m'avoir donné la chance de faire mes études de maîtrise dans son laboratoire, ainsi que pour sa disponibilité.

- Les étudiants et membres du laboratoire, présent et passé, Mirela Pascariu, Vibol Ing, Johanne Bertrand, Patrick Sénéchal et Vanessa Plouffe. Merci à tous et toutes, que ce soit pour votre aide au niveau scientifique, ou la bonne humeur dont vous avez su faire preuve tout au long de ces années que j'ai passé au laboratoire. Un grand merci en particulier à Johanne Bertrand pour m'avoir fait mes cultures de neurones pendant cette maîtrise.

- Mes parrains, Roger Lippe et Karl Fernandes, pour leurs conseils éclairés sur mon projet de recherche.

- Un grand merci à Michel Lauzon, pour son aide technique sur la microscopie optique confocale et les logiciels informatiques, ainsi que pour sa bonne humeur continue. Sans lui, cette maîtrise n'aurait pas été aussi agréable.

- Les étudiants et membres du département de Pathologie et Biologie Cellulaire.

1.INTRODUCTION

1.1.Le Neurone

1.1.1.Le système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) est le centre de régulation et d'intégration du système nerveux et est composé du cerveau et de la moelle épinière. Les deux classes majeures de cellules du SNC sont les neurones et les cellules gliales, ces dernières servant de soutien et modulant l'activité des neurones (Auld and Robitaille, 2003). Les neurones constituent les unités fonctionnelles du SNC et acheminent les messages sous forme d'influx nerveux. Ces cellules sont dites polarisées et sont composées de quatre régions distinctes : le corps cellulaire, les dendrites, l'axone et les terminaisons pré-synaptiques (Figure 1, p6). Les dendrites constituent la structure réceptrice des signaux électriques, alors que l'axone forme la structure conductrice, qui achemine l'influx nerveux à d'autres neurones ou à des effecteurs. Les terminaisons synaptiques forment la structure émettrice/sécrétrice des neurones et libèrent des neurotransmetteurs dans l'espace extracellulaire (Bartlett and Banker, 1984b). Les neurotransmetteurs vont exciter ou inhiber les neurones ainsi que les cellules effectrices avec lesquels l'axone forme un contact (Kandel et al., 2000).

1.1.2.Le cytosquelette neuronal

1.1.2.1.Les microtubules

Les microtubules (MTs) sont composés de 13 protofilaments qui s'assemblent pour former une structure tubulaire de 25 à 28nm de diamètre. Chaque protofilament est à son tour constitué de plusieurs dimères de tubuline α et β , qui sont liés au guanosine triphosphate (GTP), lorsqu'ils s'ajoutent aux MTs (Hirokawa, 1991; Kandel et al., 2000). Les MTs subissent un phénomène d'instabilité dynamique, c'est-à-dire que certains s'allongent alors que d'autres raccourcissent. Cela se produit grâce à des événements de polymérisation-dépolymérisation de préférence à l'extrémité (+) de ces filaments polaires (Horio and Hotani, 1986; Mitchison and Kirschner, 1984, 1988). Les MTs jouent un rôle déterminant dans le développement et le maintien des prolongements neuronaux (Ludin and Matus, 1993). Les neurones matures contiennent donc également des MTs stables grâce à l'action des protéines associées aux MTs (MAPs), qui jouent un rôle dans leur assemblage et leur stabilisation (Hirokawa, 1994; Horio and Hotani, 1986).

1.1.2.2.Les neurofilaments et les microfilaments d'actine

Les neurofilaments (NFs) sont des filaments intermédiaires de la cellule nerveuse d'environ 10nm (Kandel et al., 2000), formés de trois sous-unités protéiques fibreuses qui diffèrent par la longueur de leur domaine C-terminal : chaîne légère (NF-L), moyenne (NF-M) et lourde (NF-H) (Lee and Cleveland, 1996). Les NFs constituent la structure la plus stable du cytosquelette et sont presque totalement polymérisés. Ils sont donc localisés dans des régions de la cellule qui nécessitent une plus grande stabilité, comme l'axone des neurones (Grant and Pant, 2000). Les NFs sont également impliqués dans l'établissement

du diamètre radial de l'axone via leur nombre (Xu et al., 1996) et leur état de phosphorylation (de Waegh et al., 1992).

Les microfilaments d'actine sont les filaments les plus minces du cytosquelette, avec un diamètre d'environ 5nm. Dans les neurones, les microfilaments sont composés des isoformes β et γ , des monomères globulaires d'actine enroulés en double hélice (Bamburg et al., 1991; Kandel et al., 2000). Les microfilaments d'actine sont des structures polaires et dynamiques, la polymérisation se faisant principalement à l'extrémité (+) en présence d'ATP (Ludin and Matus, 1993). Il existe un grand nombre de protéines de liaison à l'actine qui permettent de former un réseau dense et complexe de filaments en treillis concentrés en périphérie de la cellule, juxtaposés à la membrane plasmique (Kandel et al., 2000; Luo, 2002). Chez les neurones immatures, ils sont concentrés dans le cône de croissance et les neurites en formation, où ils jouent sur sa motilité et donc sur la pousse neuritique (Luo, 2002; Suter and Forscher, 2000). Dans les neurones matures ils sont concentrés dans les épines dendritiques et interviennent dans la transmission synaptique (Kaeck et al., 1999).

1.1.3. La polarité neuronale

Avant d'atteindre leur maturité, les neurones subissent une série de modifications morphologiques et biochimiques qui mènent à l'acquisition de leur polarité. Plusieurs aspects distinguent l'axone des dendrites au niveau morphologique. Tout d'abord, les dendrites prolifèrent plus lentement et plusieurs à la fois, contrairement à l'axone (Dotti et al., 1988). Ensuite, les dendrites sont relativement courtes, droites, possèdent de nombreux embranchements en forme de « Y » et leur diamètre, épais à la base, s'amincit progressivement vers l'extrémité (Bartlett and Banker, 1984a; Caceres et al., 1986). Par

microscopie, on distingue des épines sur ces prolongements dendritiques (Bartlett and Banker, 1984b). L'axone est long, souvent tortueux et son diamètre est assez uniforme, bien que plus mince que celui de la portion distale des dendrites (Bartlett and Banker, 1984a, b). Enfin, le cône de croissance des axones est généralement plus gros que celui des dendrites (Bradke and Dotti, 1999). Au niveau du cytosquelette, les axones contiennent plus de NFs que les dendrites (Mattson, 1999). La densité des MTs est également plus grande dans l'axone que dans les dendrites et l'espacement entre ceux-ci est plus petit dans l'axone (Bartlett and Banker, 1984b). Enfin, la polarité des MTs est uniforme dans l'axone (toutes les extrémités (+) sont orientées vers les terminaisons axonales), alors qu'elle est mixte dans les dendrites (Figure 1, p6) (Baas et al., 1989; Baas et al., 1988). Les organelles sont généralement les mêmes dans les dendrites et dans le corps cellulaire, bien que la concentration de certaines décroît en s'éloignant du corps cellulaire (Kandel et al., 2000). Certaines organelles sont pratiquement absentes de l'axone, comme l'appareil de golgi (De Camilli et al., 1986), le réticulum endoplasmique rugueux et les lysosomes (Kandel et al., 2000). L'axone est par contre riche en vésicules synaptiques (Cameron et al., 1991). Certaines protéines sont aussi distribuées de façon différentes, comme les MAPs : la MAP2 est dendritique (Caceres et al., 1984; Caceres et al., 1986), alors que la Tau est principalement axonale (Mandell and Banker, 1996).

1.1.4.Le transport axonal

L'intégrité de la machinerie du transport axonal est essentielle à la survie neuronale. Des mutations affectant les protéines motrices ou des facteurs régulant la stabilité des MTs ont été associés à la dégénérescence des motoneurones (Guzik and Goldstein, 2004; Holzbaur, 2004). Deux familles de protéines motrices associées aux MTs et utilisant l'ATP

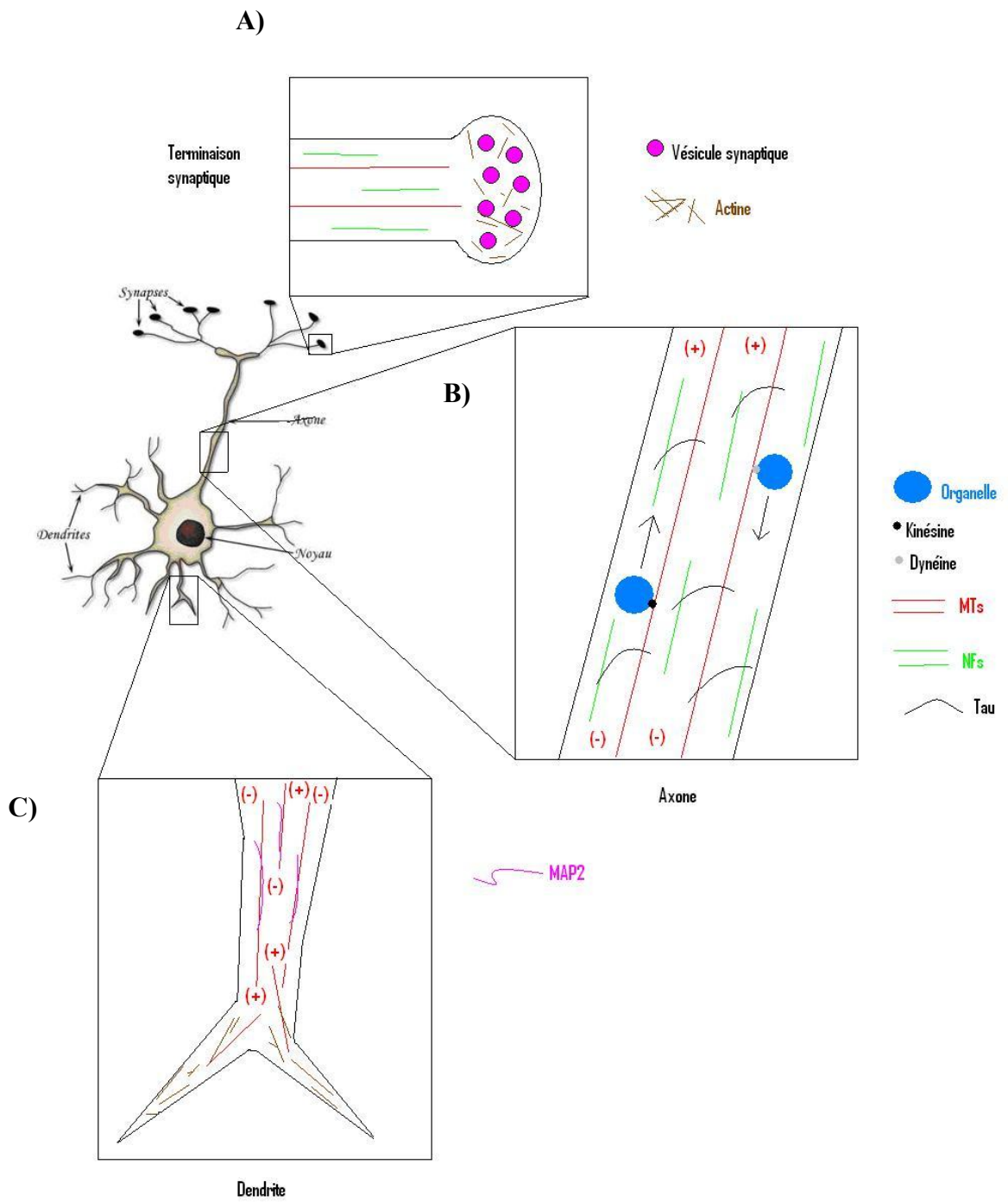
ont été identifiées comme étant impliquées dans le transport axonal : la kinésine et la dynéine (Hirokawa, 1998). Les dynéines sont responsables du transport rétrograde dans l'axone, dirigé vers l'extrémité (-) des MTs (Figure 1, p6) (Paschal et al., 1987). Les kinésines sont responsables du transport antérograde dans l'axone, dirigées vers l'extrémité (+) des MTs (Brady et al., 1982; Vale et al., 1985). Cependant, certaines kinésines sont aussi capables de mouvement rétrogrades le long des MTs axonaux (Hirokawa et al., 2009).

Figure 1 : le cytosquelette et les moteurs neuronaux

A) Les éléments du cytosquelette sont répartis de manière différente dans les différents compartiments du neurone. Les axones et la terminaison synaptique possèdent des MTs, des NFs, des micro-filaments d'actine, ainsi que de la protéine Tau. Les MTs sont tous orientés dans le même sens, l'extrémité (+) vers la terminaison synaptique. De plus, la terminaison synaptique contient un grand nombre de vésicules synaptiques renfermant des neurotransmetteurs.

B) Au niveau morphologique, l'axone est de taille uniforme, assez large et plus long que les dendrites. Il contient des MTs tous orientés dans le même sens, l'extrémité (+) vers la terminaison synaptique, ainsi que des NFs et de la protéine Tau. Les organelles sont transportées de façon antérograde par la famille des protéines motrice kinésine et de façon rétrograde par la famille des dynéines.

C) Les dendrites sont larges à la base, étroites à leurs extrémités et possèdent plusieurs embranchements. On y retrouve aussi des MTs, ainsi que des micro-filaments d'actine et de la MAP2. Les MTs étant orientés dans les deux sens, les kinésines et les dynéines effectuent des mouvements vers, ou s'éloignant du corps cellulaire.



1.2.La protéine Tau

La famille des MAPs compte plusieurs membres, partageant la même fonction de liaison aux MTs. La MAP2 et la Tau sont impliqués dans la polarisation neuronale (Mandell and Banker, 1996). La Tau fait partie des MAPs de faible poids moléculaire (Viereck et al., 1988).

1.2.1.Structure de Tau

Le gène codant pour la protéine Tau contient 16 exons (Neve et al., 1986), dont l'épissage alternatif génère six isoformes de la protéine dans le cerveau humain (Figure 2, p10) (Andreadis et al., 1992; Buee et al., 2000; Couchie et al., 1992; Goedert et al., 1992; Nelson et al., 1996; Sawa et al., 1994). Les isoformes de Tau diffèrent par la présence de 3 ou 4 séquences répétées dans la région C-terminale, codées par les exons 9 à 12 (Buee et al., 2000; Goedert et al., 1989b). Elles diffèrent également par l'absence ou la présence de 1 ou 2 inserts dans la portion N-terminale, codées par les exons 2 et 3 (Goedert et al., 1989a; Himmler et al., 1989). Seule l'isoforme dont les exons 2, 3 et 10 ont été épissés est exprimée dans le cerveau fœtal, alors que les six isoformes apparaissent durant la période postnatale du cerveau adulte (Goedert et al., 1989b; Kosik et al., 1989) (Figure 2, p10). Les séquences R1 à R4 de la région C-terminale sont constituées de répétitions très conservées, séparées les unes des autres par des régions moins conservées (Himmler et al., 1989; Kanai et al., 1989; Lee et al., 1989) et forment le domaine de liaison aux microtubules (Figure 3, p12). Les deux inserts dans la partie N-terminale forment une région très acide, suivie par une région riche en proline qui est plutôt basique (Buee et al., 2000). Cette portion est définie comme étant le domaine de projection de la protéine Tau car il fait saillie à la

surface des MTs (Figure 3, p12) (Hirokawa et al., 1988). L'ensemble de la molécule forme une protéine hydrophile qui adopte une structure allongée en forme de bâtonnet (Hirokawa et al., 1988).

Figure 2 : représentation des différentes isoformes de la protéine Tau humaine du SNC générées par épissage alternatif.

Modifié de Buée L. et al., *Brain Res Brain Res Rev*, 2000

‘Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorder’

Le gène codant de la protéine Tau est situé sur le chromosome 17 (17q21) et comprend 16 exons. L'épissage alternatif de ces exons génère six isoformes de la protéine de 352 à 441 acides aminés. Les six isoformes diffèrent par la présence ou l'absence de 1 ou 2 inserts (29 ou 58 acides aminés) codés par les exons 2 et 3 dans la portion N-terminale. Les isoformes possèdent aussi soit 3 ou 4 répétitions de 31 ou 32 acides aminés, qui sont codés par les exons 9 à 12, dans la partie C-terminale de la protéine. Ces séquences sont constituées de répétitions très conservées de 18 acides aminés, séparées les unes des autres par des domaines moins conservés de 13 ou 14 acides aminés. Dans le cerveau fœtal, seule l'isoforme Tau3R est exprimée, alors que les six isoformes sont exprimées dans le cerveau humain adulte. L'isoforme de Tau possédant les 4 répétitions ainsi que la région codée par les exons 2 et 3 est nommée Tau4R.

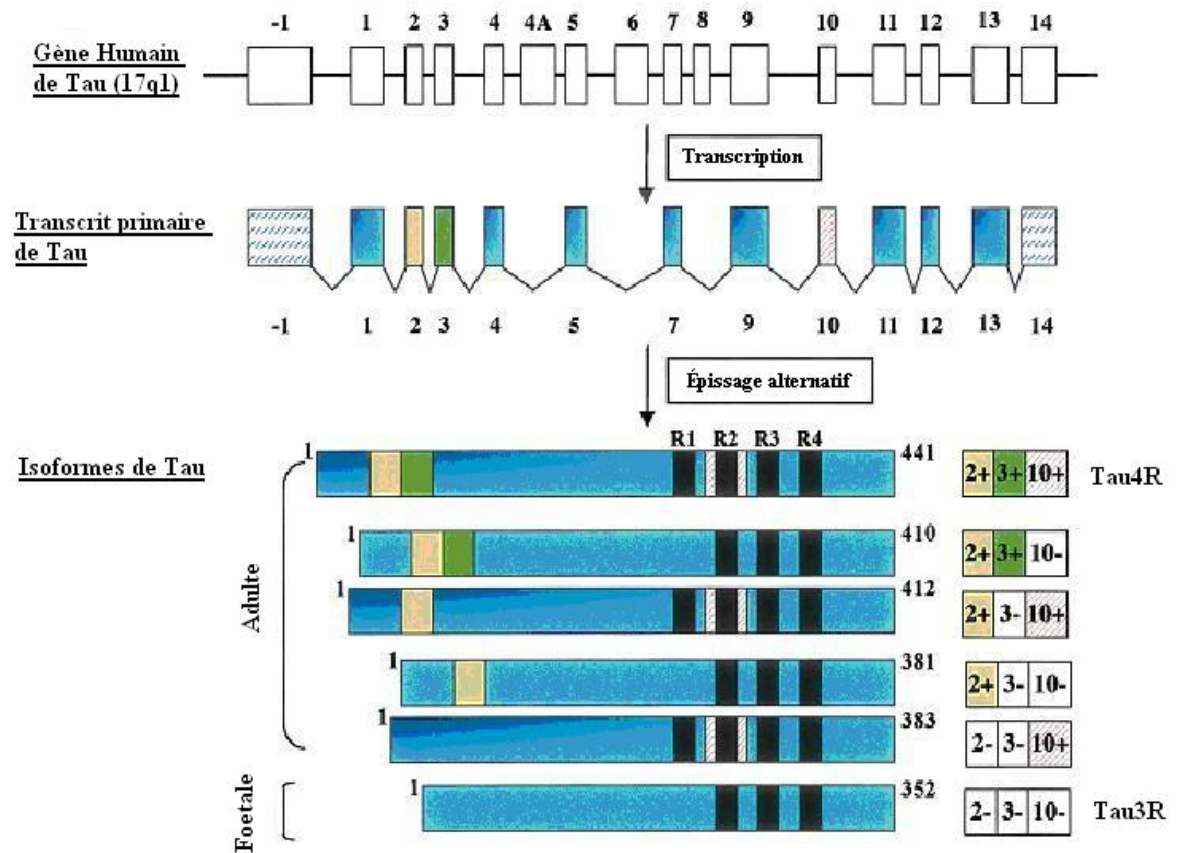
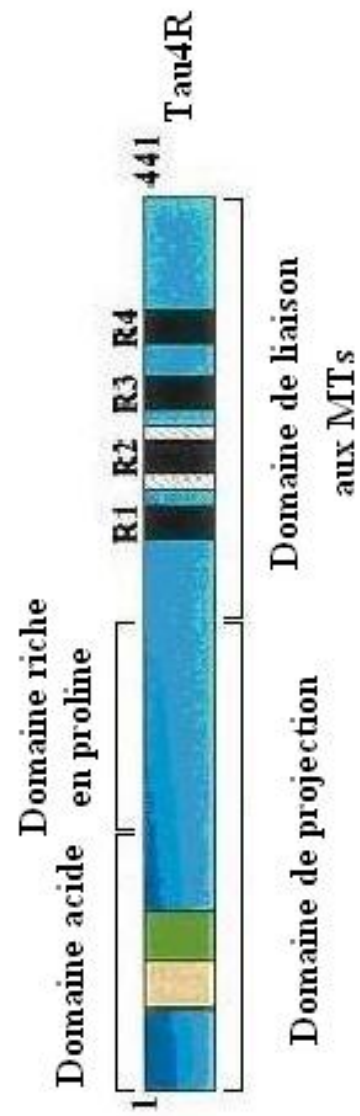


Figure 3 : domaines de la protéine Tau

Modifié de *Buée L. et al., Brain Res Brain Res Rev, 2000*

‘Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorder’

Les séquences répétitives R1 à R4 de la région C-terminale forment le domaine de liaison aux microtubules de la protéine Tau. Les deux inserts dans la partie N-terminale, correspondant aux exons 2 et 3, forment une région très acide, suivis par une région basique riche en résidus proline. Ces deux régions combinées forment le domaine de projection de la protéine.



1.2.2.Localisation de Tau

Tau est une protéine qui se retrouve principalement dans l'axone (Binder et al., 1985), que ce soit pour la forme juvénile ou pour les isoformes adultes (Brion et al., 1988). Une étude a montré que la Tau était synthétisée dans le corps cellulaire, puis transportée dans l'axone par la kinésine (Utton et al., 2005). Cependant, depuis plusieurs années déjà, des travaux ont montré la présence d'une synthèse protéique locale dans l'axone (Giuditta et al., 2008). Des études ont montré l'existence de ribosomes et d'ARNm de Tau dans l'axone. La localisation de l'ARNm de Tau est déterminée grâce à la présence d'un signal de ciblage axonal situé dans la région 3' non traduite, qui permettrait alors son transport le long des MTs suite à son association avec des protéines de liaison à l'ARN (Aronov et al., 2001, 2002; Litman et al., 1994; Litman et al., 1993). Une synthèse protéique locale de Tau pourrait donc se produire et avoir lieu suite au transport de son ARNm dans l'axone.

1.2.3.Rôles de Tau

1.2.3.1.Formation de l'axone

Des études utilisant des ARN antisens pour inhiber l'expression de la protéine Tau ont montré que son absence entraînait des défauts dans la formation des neurites (Caceres and Kosik, 1990; Caceres et al., 1991; Kempf et al., 1996). Tau jouerait donc un rôle essentiel dans l'établissement de la polarité neuronale. L'expression de Tau dans les cellules d'insecte non neuronales a induit la formation de longues expansions cytoplasmiques, appuyant son rôle dans la formation des neurites (Knops et al., 1991). Chez des souris où le gène de Tau a été inactivé (Tau-KO), on a observé une diminution de la stabilité des MTs et une modification de leur organisation dans certains axones de petit

calibre (Harada et al., 1994). Ces axones présentaient une diminution de la densité microtubulaire, ainsi qu'une diminution de la fréquence des ponts entre les MTs. Une augmentation de la MAP1 a pu venir compenser l'inhibition de Tau, ce qui expliquerait l'absence d'anomalies plus importante de l'élongation axonale ou de la polarisation neuronale. En effet, la MAP1 possède une redondance fonctionnelle avec Tau (DiTella et al., 1996; Takei et al., 2000). Ces souris Tau-KO ont développé une faiblesse musculaire et des altérations comportementales à un âge très avancé, suggérant ainsi une certaine atteinte neurologique due à l'absence de Tau (Harada et al., 1994; Ikegami et al., 2000).

1.2.3.2.Régulation de la structure de l'axone

Tau était connue de longue date comme interagissant et induisant la polymérisation de la tubuline *in vitro* (Cleveland et al., 1977; Serrano et al., 1985; Weingarten et al., 1975). Tau a été montré comme étant essentielle pour l'initiation de l'assemblage des MTs (Al-Bassam et al., 2002; Kar et al., 2003), ainsi que pour leur élongation à partir de tubuline purifiée (Brandt and Lee, 1993; Witman et al., 1976). *In vivo*, lorsque la protéine Tau a été exprimée dans des fibroblastes qui n'en contenaient pas de façon endogène, elle s'est associée spécifiquement avec les MTs. Cette association a induit une augmentation de la polymérisation de la tubuline (Kanai et al., 1992; Kanai et al., 1989) et une stabilisation des MTs contre la dépolymérisation (Drubin and Kirschner, 1986). D'autres études ont montré que l'efficacité de Tau à se lier aux MTs et à promouvoir leur assemblage était meilleure pour les isoformes Tau4R (Goedert and Jakes, 1990; Lee et al., 1989). De plus, on a aussi montré que la région comprise entre les répétitions R1 et R2 possédait une forte affinité pour les MTs (Goode and Feinstein, 1994). Le domaine riche en proline a été également impliqué dans la liaison de la protéine Tau avec les MTs. En effet, elle a renforcé cette

liaison et augmenté l'assemblage des MTs grâce à des interactions intramoléculaires entre cette région et le domaine de liaison aux MTs (Goode et al., 1997). Des études ont montré que le domaine de projection de Tau déterminait l'espacement entre les MTs de l'axone (Chen et al., 1992; Hirokawa et al., 1988; Leclerc et al., 1996).

La protéine Tau a la capacité d'interconnecter les MTs avec les autres composants du cytosquelette, réduisant leur flexibilité (Matus, 1994). En effet, des études ont montré que Tau pouvait interagir directement avec les microfilaments d'actine (Correas et al., 1990; Henriquez et al., 1995). La protéine Tau pourrait aussi interagir indirectement avec les microfilaments d'actine, par l'intermédiaire de la spectrine (Carlier et al., 1984). La spectrine est une protéine qui a été impliquée dans l'intégrité de la membrane plasmique et du cytosquelette d'actine (Dubreuil, 2006). De nombreux travaux ont montré que la protéine Tau interagissait aussi avec les NFs (Aamodt and Williams, 1984; Heimann et al., 1985; Leterrier et al., 1982). Le domaine de projection de Tau a été montré comme interagissant également avec la membrane plasmique, par l'intermédiaire de kinases telles que fyn (Brandt et al., 1995). De plus, le complexe Tau/fyn a été montré comme interagissant avec l'actine (Lee et al., 1998). Toutes ces études ont donc montré que Tau était capable d'interagir avec les différents éléments du cytosquelette et la membrane plasmique, les interconnectant entre eux.

1.2.3.3.Motilité des organelles dans l'axone

Une controverse règne depuis plusieurs années sur l'implication de Tau dans le transport axonal. Plusieurs modèles cellulaires, neuronaux et non-neuronaux, ont montré qu'une sur-expression de Tau inhibait le transport kinésine-dépendant de plusieurs types d'organelles, notamment les endosomes (Dubey et al., 2008; Ebner et al., 1998; Seitz et

al., 2002; Stamer et al., 2002; Vershinin et al., 2007), ainsi que le transport dynéine-dépendant (Dixit et al., 2008). Récemment, il a été démontré que Tau interagit avec la dynactine (Magnani et al., 2007), une protéine essentielle à l'activité de la dynéine (Schroer, 2004), soulignant l'effet de Tau sur cette protéine motrice. D'autres travaux ont montré que la sur-expression de Tau ne semblait pas affecter directement la mobilité des moteurs kinésine et dynéine (Morfini et al., 2007; Yuan et al., 2008). Très récemment, il a été démontré que ce serait la présence de filaments insolubles de Tau dans les neurones qui perturberait le transport axonal (LaPointe et al., 2009).

La régulation du transport axonal par Tau est encore sujette à controverse, mais d'autres groupes ont montré que Tau pouvait interagir avec divers organelles. En effet, la protéine Tau a régulé l'attachement de l'appareil de golgi sur les MTs (Farah et al., 2006). La sur-expression de Tau a entraîné une fragmentation de l'appareil de golgi (Liazoghli et al., 2005). Une augmentation de l'interaction de Tau avec le réticulum endoplasmique (RE), ainsi que du contact RE/mitochondrie, ont été observés chez des souris sur-exprimant une forme mutante de Tau humaine hyperphosphorylée (Perreault et al., 2009). La protéine Tau avait été déjà identifiée comme partenaire des mitochondries, permettant la liaison de celles-ci avec les MTs (Rendon et al., 1990).

1.2.3.4. Signalisation cellulaire

Tau jouerait également un rôle dans la transduction du signal impliquant la phospholipase C- γ , enzyme centrale dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire (Noh et al., 1995), en s'y liant par l'intermédiaire de sa région riche en proline. (Hwang et al., 1996; Jenkins and Johnson, 1998). Une étude très récente a aussi montré que Tau pourrait interagir avec la sous-unité p85 α de la PI(3)-kinase, enzyme impliquée dans une

très grande variété de voies de signalisation cellulaires, telles que la survie, la croissance, la prolifération et la motilité (Reynolds et al., 2008). Cette même étude a présenté l'interaction de Tau avec plusieurs molécules impliquées dans des voies de signalisation, interaction inhibée ou diminuée quand Tau est phosphorylée.

1.2.4.Phosphorylation de Tau

1.2.4.1.Rôle physiologique de la phosphorylation

La phosphorylation de Tau jouerait un rôle important dans le développement, l'isoforme fœtale étant beaucoup plus phosphorylée dans le SNC embryonnaire que chez l'adulte (Kanemaru et al., 1992; Watanabe et al., 1993). De plus, il a été montré que l'état de phosphorylation des six isoformes de Tau diminue avec l'âge (Mawal-Dewan et al., 1994). La phosphorylation constitue une des principales modifications post-traductionnelle de Tau, vu qu'on a dénombré plus de 80 sites potentiels de phosphorylation (Avila et al., 2004). De nombreuses études ont permis d'identifier les kinases et phosphatases impliquées dans l'état de phosphorylation (Hanger et al., 2009; Stoothoff and Johnson, 2005). Il existe un vaste panel d'anticorps capables de détecter la phosphorylation d'un résidu, ce qui permet d'étudier cet aspect très particulier de la protéine Tau. Le fait que Tau possède autant de sites de phosphorylation et qu'un grand nombre d'interactions sont diminuées, voire inhibées quand Tau est phosphorylée, laisse supposer qu'elle est finement régulée et possède une multiplicité d'interacteurs.

1.2.4.2.L'hyperphosphorylation de Tau, forme pathologique

Les tauopathies regroupent les pathologies où la protéine Tau est impliquée. Elles sont caractérisées par des agrégats de protéine Tau hyperphosphorylée, aussi appelés agrégats neurofibrillaires (NFTs), composés de filaments hélicaux pairés (PHFs). Plusieurs études ont démontrées qu'une accumulation de la protéine Tau hyperphosphorylée se produisait avant la formation des NFTs (Bancher et al., 1989; Braak et al., 1994), la phosphorylation anormale de Tau faciliterait donc la transformation en PHFs (Lee et al., 1991; Lee and Trojanowski, 1992). L'hyperphosphorylation de Tau a entraîné plusieurs modifications de sa conformation et de sa fonction au sein du neurone. Récemment, une étude a montré qu'elle se repliait sur elle-même (Jeganathan et al., 2008), puis formait des agrégats (Abraha et al., 2000; Alonso et al., 2001; Haase et al., 2004; Sato et al., 2002). La protéine Tau hyperphosphorylée qui s'est associée aux PHFs devient plus résistante au clivage par les protéases cellulaires, ce qui contribuerait à son accumulation dans la cellule (Johnson, 1992; Litersky and Johnson, 1992, 1995; Yang and Ksiezak-Reding, 1995). Plusieurs études ont montré que la Tau hyperphosphorylée présentait une diminution d'affinité pour les MTs, entraînant une diminution de leur polymérisation (Drechsel et al., 1992; Lindwall and Cole, 1984). L'interaction avec la membrane plasmique, dépendante d'une dé-phosphorylation au niveau de la zone riche en proline de Tau, a aussi été affectée (Arrasate et al., 2000; Maas et al., 2000). Dans les tauopathies, l'apparition de Tau agrégée a été reliée à la perte de MTs et à une interruption du trafic axonal (Pollak et al., 2003; Terry, 1996). L'hyperphosphorylation de Tau par un système de dérégulation de kinases et phosphatases a donc été proposée comme dissociant Tau des MTs et donc déstabilisant les MTs et le transport axonal (Feinstein and Wilson, 2005; Mandelkow et al., 2003; Mi and Johnson, 2006; Trojanowski and Lee, 1994). Des études *in vitro* ont démontré que

l'hyperphosphorylation de Tau pouvait en effet induire l'effondrement des MTs (Ebner et al., 1999). Pourtant, l'hypothèse voulant que Tau décrochait des MTs quand elle devenait hyperphosphorylée semblerait remise en question par une nouvelle étude (Planel et al., 2008). En effet, cette étude a montré *in vitro* et *in vivo*, en utilisant des souris exprimant seulement la Tau humaine, que l'hyperphosphorylation n'affectait pas la stabilité des MTs et qu'il n'y avait pas d'effondrement des MTs.

1.2.5.Tau et Neuropathologie

1.2.5.1.Les tauopathies

Les tauopathies regroupent un grand nombre de pathologies, comme la maladie d'Alzheimer, la démence fronto-temporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17 (FTDP-17), la dégénérescence cortico-basale, la démence à grains argyrophilique, et la paralysie supra-nucléaire progressive (Buee et al., 2000; Lee et al., 2001). Toutes ces pathologies neurodégénératives ont été caractérisées par une perte neuronale et présentaient une accumulation intracellulaire de la protéine Tau en dépôts filamenteux insolubles (Goedert et al., 1988; Grundke-Iqbal et al., 1986a; Kosik et al., 1988; Lee et al., 2001; Wischik et al., 1988). Ces filaments insolubles ont été nommés PHFs ou filaments droits, en fonction de leur aspect (Kidd, 1963; Spillantini and Goedert, 1998) et étaient composés principalement de protéine Tau anormalement hyperphosphorylée (Bramblett et al., 1992; Grundke-Iqbal et al., 1986b; Lee et al., 1991; Morishima-Kawashima et al., 1995). Ces filaments s'agrégeaient ensuite pour former les NFTs, qui s'accumulaient dans le corps cellulaire du neurone (Braak et al., 1994; Kowall and Kosik, 1987).

1.2.5.2.Mutations de Tau et neurodégénérescence

La pathologie d'Alzheimer, la plus connue des tauopathies, a été définie par la présence intra-neuronale de NFTs, ainsi que de plaques séniles constituées de dépôts extracellulaires de β -amyloïdes (Buee et al., 2000). Une grande partie des recherches s'était longtemps concentrée sur la protéine β -amyloïde, négligeant le rôle de Tau qui ne serait qu'un épiphénomène (Hardy and Selkoe, 2002). Mais des études ont montré sans équivoque que Tau, à elle seule, était capable de causer une neurodégénérescence. En effet, plusieurs études ont montré que la démence fronto-temporale FTDP-17 était due à des mutations (P301L, V337M, R406W) dans le gène de Tau (Clark et al., 1998; Hong et al., 1998; Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998). Ces données sont venues renforcer l'importance de Tau dans le cadre des neuropathologies. Depuis, plusieurs études ont cherché la relation entre ces deux types de lésions dans la maladie d'Alzheimer (Davies, 2000). Une étude récente a montré que Tau serait essentielle pour la toxicité induite par le peptide A β (Roberson et al., 2007).

1.2.5.3.Modèles animaux

Plusieurs modèles animaux existent qui montrent bien l'importance de Tau dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou les démences fronto-temporales (Gotz and Ittner, 2008). Le processus d'agrégation pathologique de Tau a été reproduit *in vivo* chez les souris. Des filaments insolubles de Tau hyperphosphorylée sont apparus dans les neurones de toutes les souris qui exprimaient des formes mutantes de Tau et de certaines de celles qui exprimaient des formes normales humaines. Les régions du SNC qui étaient atteintes par la pathologie chez ces souris sont souvent les mêmes que celles affectées dans les tauopathies humaines. Il existe également des souris double et

triple transgéniques qui expriment des formes mutantes de Tau en combinaison avec d'autres protéines humaines impliquées dans les tauopathies. Ces souris ont développé des phénotypes typiques de ces maladies, incluant la formation de filaments de Tau hyperphosphorylée et une neurodégénérescence. Récemment, des modèles de poissons zébrés reproduisant des tauopathies ont aussi été mis au point (Paquet et al., 2009).

1.3.L'endocytose et les Rab-GTPases

1.3.1.Mécanisme de l'endocytose

1.3.1.1.Voies d'internalisation

L'endocytose se divise en deux catégories, la phagocytose et la pinocytose, en fonction de la taille du matériel internalisé. La phagocytose réfère à l'internalisation de larges particules (>200nm) par l'intermédiaire d'un mécanisme basé sur le cytosquelette d'actine (Castellano et al., 2001). La pinocytose réfère à l'internalisation de milieu extracellulaire et est régulée entre autre par la clathrine et la caveoline (Seto et al., 2002).

1.3.1.1.1.Endocytose clathrine-dépendante

Cette voie d'endocytose est utilisée pour le transport de protéines et de lipides provenant de la membrane plasmique ou du réseau trans-golgi (TGN) (Brodin et al., 2000). L'endocytose clathrine-dépendante est initiée par la redistribution de protéines membranaires dans les puits à clathrine (CCPs) (Brodsky et al., 2001). Ces récepteurs transmembranaires se lient directement ou indirectement à la protéine adaptatrice 2 (AP-2) (Kirchhausen et al., 1997). Ce complexe récepteur/AP-2 se lie ensuite à la clathrine, lui

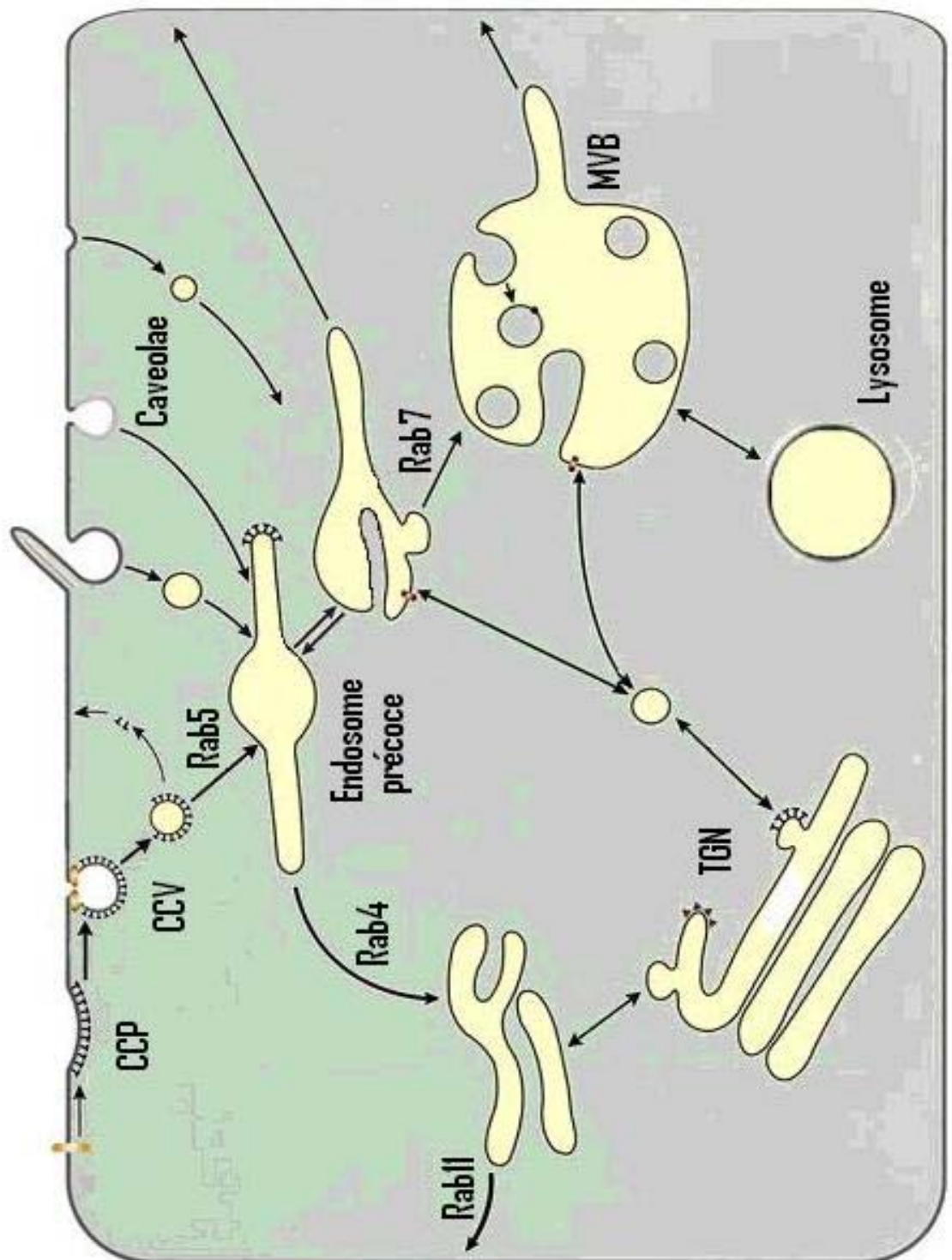
permettant de polymériser et de former une sorte de puits qui invagine la membrane vers l'intérieur de la cellule. Cette invagination nécessite l'altération localisée dans la composition des phospholipides permettant un changement de la courbure de la membrane. Une fois que l'invagination de la membrane est complétée, l'interaction entre AP-2 et la dynamine permet la fission et la formation de vésicules à clathrine (CCVs) à partir de la membrane (Marks et al., 2001; McNiven, 1998; Ringstad et al., 1997; Sever et al., 1999; van der Blik, 1999; Wang et al., 1995). Les CCVs venant de la membrane plasmique ou du TGN fusionnent ensuite avec les endosomes précoces (Figure 4, p24).

Figure 4 : schéma de la voie d'endocytose et aperçu de quelques protéines régulatrices.

Modifié de *Nixon RA. et al., Neurobiology of Aging, 2005*

“Endosome function and dysfunction in Alzheimer’s disease and other neurodegenerative diseases”

Deux voies principales permettent l’internalisation de milieu extra-cellulaire dans la cellule par endocytose, la voie clathrine et la voie caveolae-dépendante. Lors de l’endocytose à clathrine-dépendante, les molécules internalisées se retrouvent dans une invagination de la membrane plasmique où la clathrine est recrutée, formant des puits à clathrine (CCPs). Ensuite, la membrane se détache et forme des vésicules à clathrine (CCVs) qui vont fusionner avec les endosomes précoces. Les endosomes précoces sont la porte d’entrée de l’endocytose et échangent du matériel avec des vésicules provenant de la voie d’endocytose caveolae-dépendante et du TGN. Une protéine jouant un rôle essentiel dans la régulation des endosomes précoces est la petite GTPase Rab5. Les endosomes précoces peuvent soit subir une maturation et devenir des endosomes tardifs ou corps multivésiculaires (MVBs) qui vont fusionner avec les lysosomes pour dégrader le matériel internalisé. La petite GTPase Rab7 régule la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs. Certaines molécules internalisées sont recyclées plutôt que d’être dégradées, sous le contrôle des deux petites GTPases Rab4 et Rab11.



1.3.1.1.2.Endocytose Caveoline-dépendante

Les caveolae sont des invaginations de la membrane plasmique, présentes dans plusieurs types cellulaires, dont les neurones. Les caveolae sont caractérisées par leur association avec une famille de protéines appelées caveolines, dont la fonction est de créer ces structures (Kurzchalia and Parton, 1999). Les caveolines sont la plupart du temps associées à des micro-domaines de la membrane plasmique nommés radeaux-lipidiques, qui sont des structures résistantes aux détergents et enrichies en cholestérol, glycosphingolipides, glycosylphosphatidyl-inositol et plusieurs protéines membranaires (Brown and London, 1998; Simons and Ikonen, 1997). La petite guanosine tri-phosphatase (GTPase) ARF-6 se retrouve dans ces structures, ainsi que la dynamine. Suite à l'endocytose caveoline-dépendante, les vésicules obtenues peuvent fusionner et échanger du matériel avec les endosomes précoces (Figure 4, p24) (Pelkmans et al., 2004).

1.3.1.2.Dégradation ou recyclage des composés internalisés

Les endosomes précoces sont caractérisés par la présence d'une petite GTPase Rab5 qui contrôle la fusion des vésicules et leur motilité. Après internalisation par voie clathrine ou caveoline-dépendante, les vésicules formées perdent leur manteau et fusionnent avec les endosomes précoces (Nixon, 2005). Les endosomes précoces reçoivent aussi des vésicules provenant de l'appareil de golgi et des endosomes tardifs en plus des vésicules provenant de la membrane plasmique. La plupart des protéines à la surface des vésicules retournent à la membrane plasmique par l'intermédiaire des endosomes de recyclage qui sont régulés par les petites GTPases Rab4 et Rab11 (Somsel Rodman and Wandinger-Ness, 2000; van der Sluijs et al., 1992). Les endosomes précoces se transforment en endosomes tardifs grâce

à un système de conversion entre Rab5 et Rab7 (Rink et al., 2005; Vonderheit and Helenius, 2005). Durant ce processus de maturation des endosomes, un bourgeonnement interne de la surface membranaire crée des vésicules dans l'endosome tardif, ce qui forme un corps multivésiculaire (MVB) (Piper and Luzio, 2001). Cet événement est régulé par ubiquitination et un complexe protéique d'escorte ESCRT-I (Katzmann et al., 2001). Cette formation de vésicules internes permet une réduction du volume de l'endosome et permet l'accès aux enzymes digestives internalisées, soit par fusion avec les vésicules du TGN (Cowles et al., 1997) ou par fusion avec les lysosomes (Luzio et al., 2000).

1.3.2. Les Rab-GTPases

Les Rab-GTPases sont impliquées dans un grand nombre de mécanismes de transport vésiculaire, comme l'exocytose et l'endocytose. En effet, chacun des compartiments endocytaires est associé à une Rab spécifique, qui va déterminer sa localisation et sa fonction dans la cellule.

1.3.2.1. Fonction et régulation

Les Rabs sont des petites GTPase de la superfamille des Ras-GTPases, qui compte environ 150 membres chez les mammifères (Colicelli, 2004), divisée en cinq branches sur la base de séquences et de similarités fonctionnelles : Ras, Rho, Rab, Ran et Arf (Wennerberg et al., 2005). Les petites GTPases possèdent un taux d'échange et d'hydrolyse de leur nucléotide assez faible comparativement aux autres GTPases et agissent comme des interrupteurs moléculaires binaires en passant d'une forme inactive liée au GDP, à une forme active liée au GTP (Markgraf et al., 2007; Vetter and Wittinghofer, 2001). Le cycle

entre les formes GDP/GTP des Rabs est contrôlé par deux classes de protéines régulatrices. Les *Guanosine Exchange Factor* (GEFs) favorisent la formation de la forme active liée au GTP, alors que les *GTPase Activating Protein* (GAPs) accélèrent l'activité GTPase intrinsèque et la formation de la forme inactive liée au GDP.

1.3.2.2.Modifications post-traductionnelle par les lipides

Les Rab GTPases possèdent un motif spécifique contenant des cystéines dans leur partie C-terminale. Ce motif est un site de reconnaissance pour l'enzyme géranylgeranyltransférase II (RabGGTase-II), qui catalyse l'addition covalente de deux groupes geranylgeranyl, qui permet l'ancrage des Rabs dans la membrane lipidique (Wennerberg et al., 2005). Ce motif hydrophobe ainsi que les caractéristiques particulières de chaque Rab permet leur distribution dans des compartiments cellulaires spécifiques, où elles régulent le transport vésiculaire intracellulaire et le trafic des protéines à travers les différentes organelles (Zerial and McBride, 2001).

1.3.2.3.Cycle des Rabs

Les Rabs interagissent avec une multiplicité de protéines, tout au long de leur cycle de fonctionnement. Après leur synthèse, elles s'associent avec la protéine d'escorte des Rabs (Becker et al.) sous leur forme GDP, ce qui leur permet d'être acheminées à leurs membranes cible. Puis, elles interagissent avec des GEFs qui permettent aux Rabs de passer d'une forme inactive liée au GDP, à une forme active liée au GTP. Une fois sous forme GTP, les Rabs recrutent des effecteurs afin de permettre entre autres la fusion de membranes. Enfin, les Rabs interagissent avec des GAPs qui vont permettre d'accélérer le

taux intrinsèque d'hydrolyse du nucléotide et les faire passer sous forme inactive. À ce moment, elles pourront être extraites de la membrane grâce à l'intervention de la *Rab-GDP Dissociation Inhibitor* (RabGDI) et effectuer un nouveau cycle ou être dégradées (Figure 5, p31).

1.3.2.3.1. La REP et la RabGDI

Après leur synthèse sous leur forme liée au GDP, les protéines Rabs sont reconnues par la REP (Goody et al., 2005), dont il existe deux isoformes chez les mammifères, REP-1 et REP-2. Sous la forme de ce complexe, la protéine Rab est présentée à l'enzyme RabGGTase, qui catalyse l'attachement covalent d'un groupement géranylgéranyl. Le besoin d'une REP afin de permettre l'attachement de ce groupement est unique à la famille des protéines Rabs. En effet, les autres GTPases sont modifiées directement par l'enzyme GGTase (Casey and Seabra, 1996). Une réduction partielle ou totale de l'activité de la REP entraîne des phénotypes létaux (Seabra et al., 2002). La REP a aussi pour fonction de séquestrer le groupement lipidique de la Rab, afin de former un complexe soluble jusqu'à ce que la Rab rejoigne sa membrane cible. La tâche de récupérer Rabs des membranes n'est pas effectuée par REP, mais par la RabGDI (Sasaki et al., 1990; Ullrich et al., 1994), qui existe sous plusieurs isoformes dans le cerveau des mammifères (Pfeffer et al., 1995). La REP et la RabGDI présentent de grandes similarités structurales et leur manière d'interagir avec les Rabs est assez similaire. La REP se lie avec une même affinité aux formes des Rabs avec ou sans groupe géranylgéranyl (Alexandrov et al., 1999), alors que la RabGDI interagit beaucoup plus fortement avec les Rabs possédant un groupe géranylgéranyl (Shapiro and Pfeffer, 1995).

1.3.2.3.2. Les GEFs et les GAPs

La majorité des GEFs sont assez spécifiques d'une Rab ou d'une famille de Rab, et possèdent des structures et des domaines protéiques très différents (Markgraf et al., 2007; Segev, 2001; Zerial and McBride, 2001). Certaines GEFs sont en fait des complexes protéiques comprenant de nombreuses sous-unités, par exemple le complexe TRAPP-I qui a un effet GEF sur la Rab1 ou TRAPP-II sur la Rab11. D'autres couples Rabs/GEFs sont connus, comme Rab8/Mss4, Rab5/Rabex5-hVps9, Rab7/hVps39.

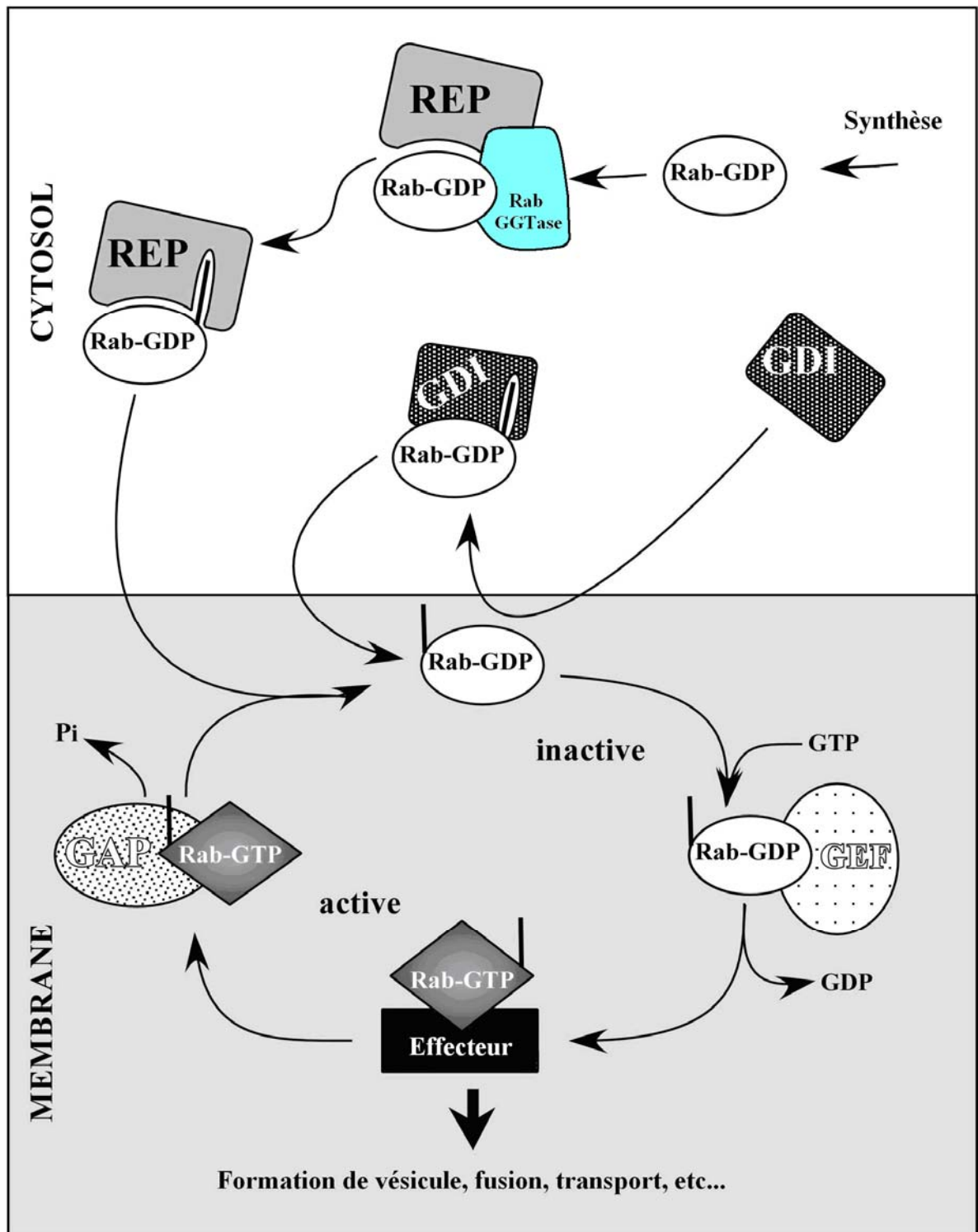
Les GAPs déjà connues des Rab-GTPases possèdent pour la plupart un domaine catalytique TBC (Tre-2, Bub2 et Cdc16) très conservé (Albert and Gallwitz, 1999; Albert et al., 1999; Strom et al., 1993). Un mécanisme catalytique en doigts d'arginine, similaire à celui des RasGAP, permet l'hydrolyse du GTP en GDP (Ahmadian et al., 1997; Pan et al., 2006; Rak et al., 2000). La mutation des résidus arginine critiques en alanines a permis l'inhibition de l'activité GAP de la RabGAP-3 (Clabecq et al., 2000). Certaines GAP n'ont pas de domaine protéique TBC, comme la p85 α qui possède un domaine BH (*BCR homology*) codant pour sa fonction GAP (Chamberlain et al., 2004). Cependant, ce domaine BH possède lui aussi une structure en doigts d'arginine. La mutation des résidus arginine critiques pour sa fonction a entraîné la perte de la fonction GAP de la p85 α . D'autres séquences protéiques codant pour une activité GAP restent vraisemblablement à découvrir.

Figure 5 : le cycle des Rab-GTPases et leurs interacteurs.

Tiré de Goody RS et al., *Cellular and Molecular Life Science* 2005

“The Structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membranes compartments”

Lors de sa synthèse, la Rab est associée à du GDP et prise en charge par la REP. Cette interaction avec la REP va permettre l'interaction avec l'enzyme RabGGTase-II, qui va catalyser l'addition covalente de deux groupes géranylgéranyl. La spécificité de séquence de la Rab ainsi que cette ancre lipidique va déterminer son interaction avec une membrane cible. La Rab inactive liée au GDP va être activée par une GEF qui va la faire passer à une forme active liée au GTP. Une fois sous forme GTP, la Rab va recruter des effecteurs afin de permettre entre autres la formation de membranes, la fusion de membranes, le transport vésiculaire, etc. Enfin, la Rab interagit avec une GAP qui va permettre d'accélérer l'hydrolyse du GTP en GDP et de la faire passer sous forme inactive. Une fois inactivée, la Rab pourra être extraite de la membrane grâce à l'intervention de la RabGDI et soit effectuer un nouveau cycle, soit être dégradée.



1.4.La protéine Rab5

1.4.1.Éléments de structure

Rab5 est une petite GTPase exprimée de façon ubiquitaire et possède trois isoformes (Bucci et al., 1995) qui régulent l'endocytose de molécules cibles spécifiques (Barbieri et al., 2000; Ulrich et al., 2005). Dans les cellules neuronales de l'hippocampe, seules Rab5a et Rab5b ont été reportées comme ayant un rôle ; à savoir l'endocytose dans les compartiments dendritiques et axonaux pour Rab5a (de Hoop et al., 1994) et l'endocytose des récepteurs au NMDA pour Rab5b (Arnett et al., 2004; Blaabjerg et al., 2003; de Hoop et al., 1994). Les trois isoformes sont vraisemblablement régulées de manières différentes par phosphorylation, même si la signification de ces événements reste encore mystérieuse (Chiariello et al., 1999). L'activation de Rab5 par sa liaison au GTP est requise pour le ciblage aux vésicules et les événements de fusion. L'expression d'un mutant Rab5-S34N avec une affinité réduite pour le GTP inhibe l'endocytose, alors que le mutant Rab5-Q79L, possédant un taux d'hydrolyse du GTP réduit, favorise la fusion des endosomes et crée des endosomes anormalement élargis (Stenmark et al., 1994). La sur-expression d'un mutant Rab5-N133I, qui est incapable de lier au GDP et GTP, induit la fragmentation des endosomes précoces (Bucci et al., 1992). Les résidus S34 et Q79 se situent dans la boucle de la protéine qui se lie au nucléotide, ainsi qu'à l'ion magnésium (Terzyan et al., 2004; Zhu et al., 2003), ce qui explique leur importance dans la fonction GTPasique de Rab5.

1.4.2.Rôles de Rab5

1.4.2.1.Endocytose clathrine dépendante

Plusieurs études ont montré l'implication de Rab5 dans la voie d'endocytose clathrine-dépendante. En effet, Rab5 régule *in vivo* la demi-vie des CCPs au niveau de la membrane plasmique (Bucci et al., 1992). De plus, Rab5 en complexe avec RabGDI s'associe *in vitro* à des CCVs purifiées de cerveau de boeuf (Horiuchi et al., 1995). Enfin, Rab5 est nécessaire *in vitro* pour la séquestration des ligands dans les puits à clathrine et la formation de vésicule (McLauchlan et al., 1998).

1.4.2.2.Activation de Rab5 et recrutement d'effecteurs

Rab5 est impliquée dans l'endocytose clathrine-dépendante, de la membrane plasmique aux endosomes précoces, ainsi que dans leur fusion (Bucci et al., 1992; Gorvel et al., 1991). Rab5 est activé par des GEFs qui possèdent un domaine Vps9 (Burd et al., 1996; Carney et al., 2006; Hama et al., 1999), telles que Rabex-5 chez les mammifères, qui active Rab5 au moment du recrutement à la membrane plasmique (Figure 6, p36) (Horiuchi et al., 1997). La Rab5-GTP est ensuite capable d'interagir avec son effecteur Rabaptin-5, qui forme un complexe avec Rabex-5 (Stenmark et al., 1995; Vitale et al., 1998; Zhu et al., 2004). Rabaptin-5 stimule l'activité d'échange de Rabex-5 sur Rab5 (Lippe et al., 2001), permettant d'obtenir plus de Rab5 active et générant un domaine endosomal enrichi en Rab5 (Figure 6, p36). De plus, Rabaptin-5 s'associe avec des protéines de transport golgiennes (Carney et al., 2006), ce qui suggère que le complexe Rabex-5/Rabaptin-5 pourrait aussi réguler la fusion avec les vésicules du TGN (Bonifacino, 2004). Finalement, Rabaptin-5 se lie à plusieurs autres formes GTP de Rabs (Valsdottir et al., 2001; Vitale et

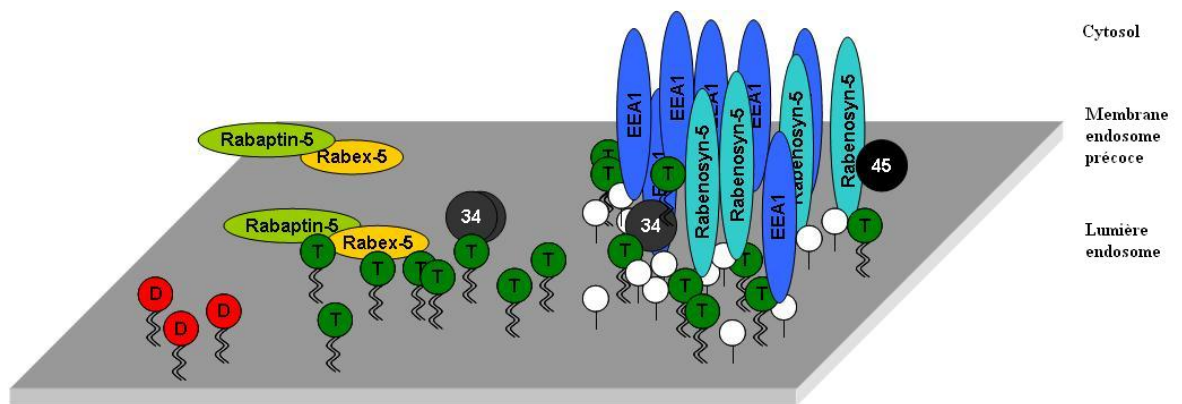
al., 1998), impliquées dans les endosomes de recyclage et les différents composants de l'appareil de Golgi (Zerial and McBride, 2001), lui permettant de réguler la liaison de Rab5 avec d'autres compartiments cellulaires. Rabaptin-5 a aussi été retrouvée dans des complexes endosomaux qui comprenaient un autre effecteur de Rab5, *Early Endosome Antigen 1* (EEA1) (McBride et al., 1999).

Figure 6 : micro-domaines de Rab5 activée

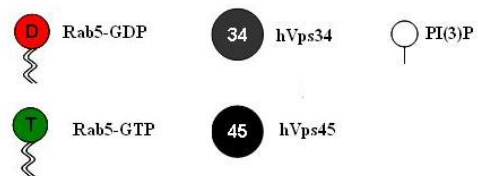
Modifié de Zerial M. et al., *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001

“Rab proteins as membrane organizers”

Lors du recrutement à la membrane plasmique, la Rab5-GDP recrute le facteur d'échange Rabex-5, qui active en retour la Rab5. La Rab5 sous forme GTP recrute alors la Rabaptin-5, qui stimule l'action de Rabex-5 sur Rab5, formant ainsi un domaine enrichi en Rab5-GTP. EEA1 est alors recruté par la Rab5-GTP ainsi que par du PI(3)P. La PI(3)-kinase hVps34 qui produit le PI(3)P est aussi recruté par la Rab5-GTP. La Rabenosyn-5 est recrutée de la même manière que EEA1, en se liant à la fois à la Rab5-GTP et au PI(3)P. Rabenosyn-5 se lie à une PI(3)-kinase hVps45 qui n'interagit pas directement avec Rab5. Cette cascade d'interaction permet la formation de micro-domaines de Rab5 active et de ses effecteurs.



Légende :



1.4.2.3.Création de micro-domaines enrichis en Rab5 active et évènements de fusion

Le rôle essentiel de la formation de ce complexe Rab5-GTP/Rabex-5/Rabaptin-5 est le recrutement de EEA1, qui est impliquée dans le rapprochement et la fusion des membranes des endosomes précoces (Callaghan et al., 1999; Christoforidis et al., 1999; Mills et al., 1998; Simonsen et al., 1998). EEA1 possède un site de liaison à Rab5 ainsi qu'au phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P) (Mu et al., 1995; Patki et al., 1997; Simonsen et al., 1998) et son recrutement dépend de la présence de la Rab5-GTP et du PI(3)P (Li et al., 1995; Stenmark et al., 1996). La PI(3)-kinase hVps34 qui produit le PI(3)P est aussi recrutée par la Rab5-GTP, régulant la coordination spatiale et temporelle des deux sites de liaison de EEA1 sur la membrane endosomale (Christoforidis et al., 1999). Cette cascade d'interactions de la Rab5 active permet la formation de micro-domaines de Rab5 avec ses effecteurs (Figure 6, p36) (McBride et al., 1999). Ces micro-domaines permettent le recrutement de complexes protéiques SNAREs, qui permettront la fusion des membranes de deux vésicules (McBride et al., 1999). À la différence de Rab5 et de Rabaptin-5 que l'on retrouve à la fois sur les membranes des CCVs et des endosomes précoces, EEA1 se retrouve seulement sur les endosomes, lui permettant de réguler de façon directionnelle la fusion entre les CCVs et les endosomes (Barbieri et al., 1998; Rubino et al., 2000). Le mécanisme de recrutement de EEA1 est partagé par Rabenosyn-5, qui possède un site de liaison à Rab5 et un domaine de liaison PI(3)P (Nielsen et al., 2000). EEA1 et Rabenosyn-5 sont tous les deux nécessaires et jouent des rôles complémentaires dans le rapprochement et la fusion des endosomes. Rabenosyn-5 est complexée avec hVps45, une PI(3)-kinase qui n'interagit pas directement avec Rab5. De plus, Rabenosyn-5 interagit avec Rab4 liée au

GTP, ce qui suggère son implication dans la voie endosomale de recyclage (de Renzis et al., 2002).

1.4.2.4. Inactivation de Rab5

Suite à l'activation de Rab5 et aux événements de fusion, des GAPs sont recrutées afin d'inactiver Rab5 et de générer des endosomes précoces stables pouvant emprunter les voies de dégradation ou de recyclage. Une des GAPs des plus classique pour Rab5 est RN-tre, qui possède un domaine TBC dans sa région C-terminale (Haas et al., 2005; Lanzetti et al., 2007; Lanzetti et al., 2000). D'autres GAPs de Rab5 possèdent un domaine catalytique différent. La p120-GAP est une GAP pour les Ras-GTPases et pour Rab5 (Liu and Li, 1998) et son domaine catalytique *GAPette* est proche du C-terminal de la protéine (Gibbs et al., 1988; Trahey and McCormick, 1987). La tuberine qui présente une séquence d'homologie avec la Rap1-GAP au niveau du C-terminal (European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, 1993), possède une activité GAP pour Rab5 et se lie avec une forte affinité à la Rabapatin-5 (Xiao et al., 1997). p85 α est une des deux sous-unités d'une PI(3)-kinase spécifique de Rab5 (McBride et al., 1999), qui est impliquée dans la l'endocytose du facteur dérivé des plaquettes (Kapeller et al., 1993; Sorkin et al., 1993). La p85 α possède une activité GAP faible à l'encontre de plusieurs GTPases dont Rab5 (Chamberlain et al., 2004). Cette activité GAP est catalysée par un domaine BH, qui présente une certaine homologie avec des protéines Rho-GAP. De plus, son activité GAP est indépendante de son activité PI(3)-kinase.

1.4.2.5.Rab5 régule l'interaction et la motilité des endosomes précoces sur les microtubules

Deux études ont montré que Rab5 régule l'interaction des endosomes précoces avec des éléments du cytosquelette (Nielsen et al., 1999; Scheel and Kreis, 1991). L'étude de *Nielsen et al.*, a montré une co-localisation des endosomes précoces avec les MTs dans des cellules de l'épiderme transfectées avec Rab5. Une dépolymérisation des MTs provoque l'accumulation de gros endosomes, ou de regroupements d'endosomes Rab5-positifs à la périphérie de la cellule. De plus, une séparation sur gradient de sucrose des endosomes précoces libres de ceux accrochés aux MTs a montré qu'une quantité significative d'endosomes précoces co-précipite avec les MTs. L'interaction de Rab5 avec les MTs est indépendante de la protéine motrice kinésine. D'après les auteurs, cette association des endosomes avec les MTs doit être régulée par d'autres facteurs, comme par exemple une MAP. La motilité des vésicules Rab5-positives le long des MTs, régulée par la kinésine, est augmentée lorsque la Rab5 est liée au GTP (Nielsen et al., 1999).

1.4.3.Rab5 dans les neurones

1.4.3.1.Rab5 et la voie de signalisation des neurotrophines

Dans les neurones, il existe une voie alternative à la voie de dégradation, dite des *signaling endosomes* (Grimes et al., 1996; Ye et al., 2003). Cette voie de signalisation implique l'endocytose du facteur de croissance neuronal (NGF) et son récepteur TrkA à la terminaison synaptique et leur transport le long de l'axone par un mécanisme dynéine-dépendant (Barker et al., 2002; Delcroix et al., 2003; Heerssen and Segal, 2002). Le NGF est essentiel à la croissance et à la différenciation des neurites (Grimes et al., 1996; Zhang

et al., 2000). Les petites GTPases Rab5 et Rab7 jouent un rôle central au niveau de cette voie de signalisation, les endosomes précoces étant stationnaires alors que les endosomes tardifs sont mobiles (Deinhardt et al., 2006; Roux et al., 2005). Une étude récente a montré que la RabGAP-5 inactive la Rab5 très tôt dans l'endocytose à la membrane plasmique et l'empêche ainsi de recruter ses effecteurs et donc de fusionner avec d'autres vésicules (Liu et al., 2007). Les endosomes précoces contenant le NGF et le TrkA restent ainsi de petite taille, tels que décrit dans une récente étude qui montre qu'ils contiennent une seule particule de NGF couplée au TrkA et dont la taille se situe entre 50nm et 150nm de diamètre (Cui et al., 2007). La RabGAP-5 possède un domaine TBC et est une GAP pour Rab5, dont le rôle pour l'endocytose a été démontré précédemment (Fuchs et al., 2007; Haas et al., 2005).

1.4.3.2.Régulation de la taille des vésicules synaptiques

Une étude chez la drosophile a montré que Rab5 joue un rôle essentiel au niveau de la taille des vésicules synaptiques (Shimizu et al., 2003). Les neurones ont besoin de relâcher leurs neurotransmetteurs de façon quantitative, en fonction de l'étendue de leur niveau d'excitation. La quantité de neurotransmetteurs relâchés est contrôlée en les empaquetant dans des petites vésicules de tailles uniformes et en limitant le nombre de vésicules fusionnant avec la membrane plasmique. La génération de ces vésicules se fait par l'intermédiaire de la clathrine et des protéines adaptatrices, qui recrutent une quantité constante de membrane pré-synaptique (Zhang et al., 1999). L'étude de Shimizu et al., montre que l'inhibition de Rab5 induit la fusion des vésicules synaptiques et suggère que la présence de Rab5 permet de réguler la taille des vésicules synaptiques par un mécanisme encore incompris.

1.4.3.3. Phénomènes de LTP et de LTD

Un autre rôle essentiel de Rab5 à la synapse est la régulation des récepteurs glutamatergiques AMPA en post-synaptique, qui permet la plasticité synaptique et le phénomène de *Long Term Potentiation* (LTP) et de *Long Term Depression* (LTD) (Malinow and Malenka, 2002). Rab5 est impliquée dans la LTD, c'est-à-dire dans le retrait de la surface synaptique des récepteurs AMPA activés afin de diminuer le signal, par un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant (Brown et al., 2005). Une autre Rab, la Rab11 est impliquée dans la LTP, c'est-à-dire le recyclage des récepteurs AMPA des endosome vers la membrane plasmique afin d'augmenter le signal reçu (Park et al., 2004).

1.4.4.Rab5 un nouvel interacteur pour Tau ?

Un des rôles les plus connus et caractérisés de Tau est son interaction avec les différents éléments du cytosquelette, que ce soit les microtubules, les neurofilaments, ou encore les microfilaments d'actine. Mais de plus en plus d'études tendent à montrer que Tau pourrait avoir un rôle dans le transport des organelles, même s'il reste une controverse à ce sujet, ainsi que dans la transduction de signaux cellulaires. La petite GTPase Rab5 est impliquée dans le transport rétrograde des neurotrophines le long des microtubules axonaux et est capable de se lier directement aux microtubules, interaction probablement régulée par une MAP. Les deux protéines qui nous intéressent ici évoluent dans un même environnement, et agissent sur de mécanismes très proches. De plus, nos résultats préliminaires suggèrent une interaction entre Tau et la petite GTPase Rab5 (Figure 7, p56). Le présent projet de recherche de Maîtrise visait à caractériser l'interaction de Tau avec la petite GTPase Rab5.

2.MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1.Plasmides

Les plasmides suivants permettent l'expression de protéines recombinantes dans les bactéries BL-21 par induction à l'IPTG. Les protéines encodées dans un vecteur de type pGEX possèdent un tag GST. Ce tag peut-être coupé par une des trois protéases suivantes, indiquée par la lettre majuscule dans le nom du vecteur : thrombine (T), facteur Xa (X), ou *précision protéase* (P).

L'ADNc de la forme humaine de Tau (1-441), ainsi que Tau-NT (1-213) et Tau-CT (214-441) ont été clonés dans un vecteur pGEX-4T1 (*Amersham Biosciences*, ref : 27-4580-01). Les mutants de délétion de Tau DelMT-CTD (1-250), DelMT234 (1-273), DelMT34 (1-304), DelMT4 (1-335) et DelCTD (1-367) ont été produits à partir du vecteur pGEX-4T1 contenant Tau (*Mutagenex*, Piscataway, New-Jersey, USA). Les mutants ponctuels de la Tau humaine P301L, V337M et R406W ont été encodés dans un vecteur pET-3a (*Dr H. Paudel*, Bloomfield Center for Research in Aging, Lady Davis Institut, Davis-Jewish General Hospital, Montréal, Canada), les petites GTPases humaines Rab5a et Rab6a dans un vecteur pGEX-3X (*Dr Deborah Anderson*, Cancer Research Unit, Saskatoon, Saskatchewan, Canada), la Rab4a humaine dans le vecteur pGEX-2X (*Dr M. McCaffey*, Bioscience Institute, University College Cork, Cok, Ireland) et la Rab5b de souris dans un vecteur pGEX-6P1 (*Dr F. Feirreira*, Center for Developmental and Biomedical Science, University of Sheffield, Sheffield, United Kingdom).

Pour la transfection de neurones, les constructions qui ont été utilisées sont Tau, Tau-NT et Tau-CT insérés dans un vecteur pEGFP-C1 de chez *Clontech* (*Dr Ken. Kosik*,

Harvard University, Boston, MA) (Lu and Kosik, 2001). La Rab5a humaine est encodée dans un vecteur pmRFP-C3 (*Addgene Inc*, Cambridge, US, ref : 14437).

2.2. Production et purification de protéines

Une pré-culture de 50mL de milieu *Luria Bertani* (LB) (Bacto-tryptone 10g/L, Yeast-extract 5g/L, NaCl 10g/L, pH 7,5 - NaOH) et l'antibiotique adéquat a été démarrée sur la nuit (+/- 14h, 37°C, agitation à 250rpm) à partir du stock glycérol. La pré-culture saturée a été transvidée dans 2 litres de milieu frais et mise à 37°C pour 4 heures sous agitation. Les protéines ont ensuite été induites dans la culture bactérienne avec de l'IPTG (*Invitrogen life technologies*, 0,5mM final) et remises à pousser pour 3h30 supplémentaires à 37°C sous agitation. Les bactéries ont été sédimentées par centrifugation à 10krpm à 4°C pendant 10 minutes. Puis, le culot a été re-suspendu dans du PBS1X à 4°C avec des inhibiteurs de protéase (*ROCHES*, complete-EDTA free, ref : 11-873-580-001, une pastille dans 50mL) et soumis à une seconde centrifugation selon les mêmes paramètres. Le culot a ensuite été congelé à -20C et conservé pour utilisation ultérieure.

Le culot congelé a été déposé dans un mortier placé dans la glace avec deux fois son poids en alumine-A5 (*SIGMA*, ref : A2039) afin de faciliter le broyage. Le culot a été broyé pendant 2 minutes puis laissé au repos pendant 2 minutes, le tout répété six fois. Au bout du second broyage, 1,25 mg de DNase-I (*SIGMA*, ref : DN25) a été ajouté. Le broyat a été resuspendu dans 10 mL de PBS1X à 4°C et l'alumine ainsi que les débris cellulaires ont été sédimentés par centrifugation à 10krpm pendant 1h. Les protéines en solution contenues dans le surnageant ont été purifiées sur colonne de plastiques jetables (*Bio-Rad*, ref : 731-1550) de résine *Glutathione Sepharose 4B* (*GE-Healthcare*, ref : 17-0756-01) selon les recommandations du fabricant. Les protéases qui ont été utilisées pour couper le tag GST

proviennent de chez *GE-Healthcare* : thrombine (*Amersham Bioscience*, ref : 27-0846-01), facteur Xa (*Amersham Bioscience*, ref : 27-0849-01) et *precision protease* (*GE-Healthcare*, ref : 276-0843-01). La qualité de la protéine a été testée par électrophorèse sur gel d'acrylamide et coloration au bleu de coomassie, et dosée par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951) avec le kit RC-DC de chez *Bio-Rad* (ref : 500-0120).

Les protéines sans tag correspondant aux mutants ponctuels de Tau ont été purifiées par *heat stable* et resuspendues dans une solution MES (MES 100mM, EGTA 1mM, MgCl₂ 0,5mM, Na₂EDTA 10mM, pH 6,4). Cette technique repose sur le fait que la Tau est hautement résistante à la chaleur en comparaison des autres protéines, qui sont dégradées, ne conservant que la Tau en solution. Les protéines ont été produites de la même manière que décrite précédemment. Du 2-mercapto-éthanol a été ajouté à la solution de protéines bactériennes. Les protéines ont été placées dans un bain-marie à ébullition pendant dix minutes, puis dans la glace pendant la même durée. L'échantillon a été soumis ensuite à une ultra-centrifugation (*BECKMAN*, XL-70 Ultracentrifuge) à 50krpm pendant 30 minutes dans un rotor Ti-50 (*BECKMAN*). Le surnageant a été récolté et la qualité et quantité de la protéine ont été testées comme précédemment.

2.3.Recouvrement sur gel

Les protéines ont été séparées sur gel d'acrylamide (5µg par protéine purifiée en une dimension, ou 60µg de microsomes totaux en deux dimensions) en une ou deux dimensions, puis transférées sur membrane de nitrocellulose (*Bio-Rad*, ref : 162-0112). La membrane a ensuite été bloquée 30 minutes avec une solution d'albumine de sérum de bœuf (BSA) (*BIOSHOP*, ref : ALB001) à 5% dans du TBS-Tween 0,2%. Puis, la membrane a été incubée sur la nuit (+/- 14h) avec la protéine (2,5 µg/mL) dont on

recherche l'interaction dans une solution de MES-overlay (MES 50mM, MgCl₂ 2mM, EGTA 2mM, DTT 1mM, Tween-20 0,1%, NaCl 150mM, BSA 1%, pH 6,8). Le lendemain, la membrane a été lavée deux fois avec du TBS-Tween 0,2% pendant 10 minutes. Puis, la membrane a été soumise à un immuno-buvardage classique pour détecter la présence de la protéine avec laquelle la membrane a été incubée. Les protéines utilisées dans le cas des recouvrements sur gel en une dimension sont des protéines purifiées, il n'y a qu'une bande protéique sur le gel. Les figures présentées dans les résultats (Figure 8, p58 ; Figure 9, p62 ; Figure 10, p66) ne montrent donc que cette bande. Une légère dégradation a cependant pu être constatée avec les protéines purifiées par la méthode de *heath stable*. Dans ce cas, la bande présentée dans la figure était celle qui était majoritaire et toujours beaucoup plus intense que l'éventuelle interaction avec les produits de dégradation.

La technique de recouvrement sur gel peut donner des résultats non-spécifiques. Pour pallier à ce problème, nous avons utilisés trois constructions de la protéine Tau : Tau-WT (1-441), Tau-NT (1-213) et Tau-CT (214-441). Tau-NT et Tau-CT ne se recoupent pas, donc un signal spécifique devrait être détecté par un de ces domaines et la protéine pleine longueur (Tau-WT). Une fois les spots d'interaction spécifiques déterminés, ceux-ci ont été reportés sur le gel d'acrylamide et découpés pour être envoyés en spectrométrie de masse (*Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill*, Montréal, Canada). Les résultats nous ont été donnés sous forme d'une liste de protéines présentes dans le gel pour chaque spot d'interaction. Chaque protéine est accompagnée d'un score plus ou moins élevé en fonction de la probabilité de sa présence dans le gel. Ces résultats ont été triés afin d'éliminer les faux positifs. Dans un gel en deux dimensions, les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique (pI) ainsi que leur poids moléculaire. La correspondance entre les pI/poids moléculaires connus de chaque protéine et ceux observés sur le gel d'acrylamide a été vérifiée. Les protéines de la liste de résultat dont les informations

connues et observées ne correspondaient pas ont été éliminées. Parmi les protéines restantes, celles possédant un score correspondant à une bonne probabilité ont été gardées.

2.4.Immuno-isolation

Des billes magnétiques couplées à des anticorps secondaires anti-souris (*DYNAL Biotech*, Dynabeads[®] M-280 Sheep anti-Mousse IgG, ref : 112.01) ou anti-lapins (*DYNAL Biotech*, Dynabeads[®] M-280 Sheep anti-Rabbit IgG, ref : 112.03), ont été bloquées avec une solution de PBS contenant 5% de BSA, puis incubées pendant la nuit avec des anticorps primaires contre les protéines d'intérêt : Tau-1 (*Chemicon international*, ref : MAB3420), Rab5 (*Synaptic System*, ref : 108-011) clathrine (*SIGMA*, ref : C1860). Les billes magnétiques ont ensuite été incubées pendant deux heures avec agitation lente sur la roue avec l'homogénat de cerveau ou les vésicules contenues dans les synaptosomes. Les synaptosomes ont été préparés selon le protocole publié par (Bouvier et al., 2008). Brièvement, les cerveaux de souris ont été broyés et séparés sur gradient de sucrose. Après plusieurs centrifugations, la fraction contenant les synaptosomes a été récoltée et soumise à un choc osmotique avec une solution d'HEPES (*SIGMA*, ref : H3375). Les vésicules contenues dans les synaptosomes ont été séparées de la membrane plasmique et testées par immuno-isolation.

Après incubation avec l'homogénat de cerveau ou les vésicules de synaptosomes, les billes magnétiques ont été lavées plusieurs fois au PBS, puis bouillies afin de décrocher toutes les protéines attachées. L'échantillon de protéines obtenu a été séparé sur gel d'acrylamide, transféré sur membrane de nitrocellulose et analysé par immuno-buvardage.

2.5.Immuno-buvarlage

Les protéines et les standards de poids moléculaire (*Bio-Rad*, Precision Plus Protein Standards, ref : 161-0374) ont été séparés sur gel d'acrylamide 10% et transférés sur membrane de nitrocellulose. La détection de Tau et des mutants a été faite en utilisant deux anticorps, soit Tau-1 (*Chemicon international*, ref : MAB3420, épitope :202-205) ou Tau-5 (*BIOSOURCE*, ref : AHB0042, épitope : 218-235). Des concentrations de 1/500k pour Tau-1 et de 1/20k pour Tau-5 ont été utilisées, dans du TBS-Tween 0,2% avec de la BSA 5%, pour la détection directe des protéines sur la membrane, et du Tau-1 à 1/500 dans la même solution pour la détection d'un interacteur après recouvrement sur gel. Deux anticorps ont été utilisés pour Rab5, le premier de chez *Synaptic System* (ref : 108-011) en détection directe à 1/50k et le second de chez *Stressgen* (ref : KAP-GP006) pour détection après recouvrement sur gel à 1/200. Les anticorps contre Rab4 (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, ref : sc-312) et Rab6 (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, ref : sc-81913) ont été utilisés à la concentration de 1/20k. Les membranes ont été bloquées pendant 30 minutes avec du TBS-Tween 0,2% BSA 5%. Puis, les membranes ont été incubées soit 1h à température pièce avec l'anticorps primaire, ou sur la nuit à 4°C sur la roue. Après trois lavages au TBS-Tween 0,2%, les membranes ont été incubées avec des anticorps secondaires anti-souris, ou anti-lapin couplés à la peroxydase (*Jackson Immunoresearch Laboratories*, ref : 115-035-068 ou ref : 711-035-152) à la concentration de 1/10k dans du TBS-Tween 0,2% BSA 5% pendant 1h. Les membranes ont été révélée en utilisant le kit chemiluminescent (*Amersham*, ECLTM Western Blotting Detection Reagents, ref : RPN2106) et des films (*Amersham*, HyperfilmTM ECL, ref : 38906838).

2.6.Culture de neurones d'hippocampe de rat

Les cultures primaires de neurones d'hippocampe ont été préparées telles que décrites précédemment (Banker, 1998). Des hippocampes de fœtus de rats âgés de 18 jours ont été traités à la trypsine (0,25% à 37°C pour 15 minutes), puis lavés dans de la solution balancée de Hank et dissociés par plusieurs passages à travers une pipette Pasteur. Les cellules ont été déposées sur des lamelles de verre (5 lamelles par boîtes de pétri), préalablement coatées avec de la poly-lysine, puis laissées pendant 4 heures dans du *plating medium* afin de permettre l'attachement des cellules sur le substrat. Le milieu a ensuite été changé pour du Neurobasal (*Invitrogen*, Burlington, ON, Canada) auquel a été ajouté de la L-glutamine (*SIGMA*, Oakville, ON, Canada) et du B27 (*Invitrogen*, Burlington, ON, Canada). Cinq jours après la mise en culture, de la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*, Burlington, ON, Canada) a été utilisée pour transfecter les neurones de l'hippocampe avec un vecteur d'expression contenant de la Tau humain ou des mutants de Tau fusionnée avec un tag GFP fluorescent et de la Rab5a fusionnée à un tag mRFP fluorescent. Brièvement, pour chaque 2 boîtes de pétri, 1µg de d'ADN plasmidique a été mixé avec 50µl de milieu Opti-MEM (*Invitrogen*, Burlington, ON, Canada) et 4µl de Lipofectamine 2000 a été mélangé à 50µl de milieu Opti-MEM. Les deux mixtures ont été incubées pendant 5 minutes, puis mixées et laissées de côté pour 20 minutes. Le milieu de culture de chaque pétri a été enlevé, gardé à 37°C pour un usage futur et remplacé par 2mL de milieu frais auquel 40µl de mixture ADN-Lipofectamine ont été ajoutés. Après une incubation de 90 minutes à 37°C, les cellules ont été lavées avec une solution de HBSS et le milieu de culture préalablement gardé à 37°C a été remis dans chaque pétri. 24 heures après transfection, les neurones ont été fixés avec une solution de 4% de paraformaldéhyde dans du PBS pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec du 0.2% Triton X-100 dans du PBS

pendant 5 minutes. Les lamelles ont été montées dans du mowiol sur des lames de verre et visualisées avec un microscope à fluorescence axioplan.

2.7. Microscopie confocale et à fluorescence

Toutes les images de microscopie optique à fluorescence utilisées dans le comptage de structures Rab5-positives et pour la mesure de surface fluorescente ont été prises à 100X. Afin que les résultats observés ne soient dus à des niveaux de transfection différents, seuls les neurones ayant un niveau de transfection similaires ont été sélectionnés. Pour estimer le niveau de transfection, des photos du corps cellulaire de chaque neurone ont été prises en GFP avant saturation. Seuls les neurones avec des temps d'exposition proches ont été analysés

Le contenu en organelle varie le long de l'axone, principalement dans les portions proximales et distales. Pour tenir compte de cette variation sur notre analyse de répartition des endosomes le long de l'axone, l'axone de chaque neurone a été séparé en blocs de 25µm de long et les contenus des différents blocs ont été analysés séparément les uns des autres. De plus, la longueur d'un axone est variable d'un neurone à l'autre. Pour pouvoir comparer la répartition des endosomes le long de l'axone entre chaque neurone, chaque axone a été redivisé en neuf blocs. Le neurone a été reconstitué à partir des photos individuelles avec *Photoshop* avant de faire le découpage en blocs de 25 µm. Le nombre de structures rondes correspondant à des endosomes a été comptabilisé manuellement, donnant un nombre de vésicules par µm d'axone. La surface de fluorescence a été mesurée avec le logiciel d'imagerie *ImageJ* en réglant le *threshold* de façon automatique avec la méthode d'Otsu (Otsu, 1979), donnant ainsi une surface de fluorescence par µm d'axone.

2.8.Interaction GDP/GTP γ S et activité GAP

Le protocole d'interaction avec le GDP et les GTP γ S provient de celui publié par *S. Christoforidis et al., 2001*. Brièvement, deux colonnes de résine *Gluthatione Sepharose 4B* ont été chargées en protéine Rab5a-GST, puis saturées avec une solution contenant du GDP (*SIGMA*, ref : G7127) ou du GTP γ S (*SIGMA*, ref : G8634). Des quantités égales de protéine Tau ont été passées sur les deux colonnes. Après plusieurs lavages, une solution contenant le nucléotide opposé a été passée sur les colonnes, du GTP (*SIGMA*, ref : G8877) ou du GDP, afin de décrocher la Tau ayant éventuellement interagi avec la Rab5a-GST. Les quantités respectives de Tau dans les éluats ont été analysées par immuno-buvardage.

Les essais d'activité GAP de Tau ont été faits par le laboratoire du *Dr. Deborah Anderson* selon le protocole publié par *D. Anderson et al., 2005*. Brièvement, de la Rab5a a été placée en solution avec du GTP radiomarqué. Des quantités croissantes de Tau ou des mutants ponctuels et de délétion de Tau ont été ajoutés à l'échantillon. Les quantités de GDP produite en présence de : (1)-La Rab5a seule ; (2)-La Rab5a et la Tau ; (3)-La Rab5a et un contrôle positif (GAPette) ont été analysées par chromatographie sur couche mince et quantifiées à l'aide d'un *phospho-imager*. La Tau extraite de cerveau de bœuf provient de chez *Cytoskeleton* (ref : TA01).

2.9. Modèle de souris transgéniques (JNPL3)

Les souris JNPL3 utilisées proviennent des élevages Taconic (*Taconic Farms*). La lignée de souris a été développée dans le laboratoire de Mike Hutton (Lewis et al, 2000). Le modèle a été créé en micro-injectant la construction transgénique contenant le gène de la Tau humaine avec la mutation P301L sous le contrôle d'un promoteur de prion murin. On retrouve chez les souris JNPL3 de la Tau hyperphosphorylée dans les motoneurones de la moelle-épineuse.

3. RÉSULTATS

3.1. Un nouvel interacteur pour Tau, la Rab5a ?

Afin de détecter de nouveaux interacteurs potentiels pour Tau, une expérience de recouvrement sur gel couplée à la spectrométrie de masse a été mise en place. Brièvement, un échantillon de microsomes totaux (mTs) extraits d'un cerveau de rat adulte a été déposé sur gel d'acrylamide et soumis à une électrophorèse en deux dimensions. Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose. Les membranes obtenues ont été bloquées avec de l'albumine de sérum de bœuf (BSA) et incubées avec de la Tau pleine longueur (Tau-WT/1-441), ou avec des fragments tronqués de la protéine Tau (Tau-NT/1-213 et Tau-CT/214-441) (Figure 7, p56). Si une protéine présente dans les mTs était un interacteur de Tau, elle devait s'y lier. Après incubation, la présence de Tau sur la membrane a été révélée par immuno-buvardage en utilisant deux anticorps dirigés contre Tau : Tau-1 (épitope : 201-205) qui révèle Tau-NT et Tau-5 (épitope : 218-235) qui révèle Tau-CT. Les deux anticorps révélant aussi la Tau-WT, il devenait possible de passer au crible les membranes afin de mettre en relief les protéines avec lesquelles la Tau a interagi. De plus, avec les mutants Tau-NT et Tau-CT, on a pu déterminer si cette interaction impliquait la partie N ou C-terminale de Tau. Ensuite, en allant chercher précisément la zone d'interaction sur le gel d'acrylamide qui a été migré en parallèle et coloré à l'argent, nous avons été capables de déterminer par spectrométrie de masse quelle était la protéine majoritaire à cet endroit du gel et qui était potentiellement un interacteur de Tau.

Deux protéines connues pour interagir avec la Tau ont ainsi été révélées, la tubuline et les neurofilaments (NFs). Dans notre expérience, la tubuline a interagi avec Tau-CT et Tau-WT (Figure 8/A, p58), alors que la chaîne légère des NFs (NF-L) a interagi avec Tau-NT et

Tau-WT (Figure 8/B, p58). Cette interaction a été confirmée en effectuant la même expérience avec des protéines purifiées. De la tubuline et des NF-L ont été séparés sur gel d'acrylamide, transférés sur membrane de nitrocellulose et incubés avec Tau-WT, Tau-NT ou Tau-CT. L'interaction spécifique de la tubuline avec Tau-CT et des NF-L avec Tau-NT a été confirmée par immuno-buvardage avec Tau-1 et Tau-5 (Figure 8/A et 8/B, p58). Cette technique de recouvrement sur gel couplé à de la spectrométrie de masse nous a donc permis de détecter des interacteurs déjà connus pour Tau. En effet, des études ont montré que la tubuline interagit directement avec Tau-CT (Cleveland et al., 1977; Serrano et al., 1985; Weingarten et al., 1975) et les NFs interagissent directement avec Tau-NT (Aamodt and Williams, 1984; Heimann et al., 1985; Leterrier et al., 1982). Un nouvel interacteur potentiel pour Tau a ainsi été mis en évidence, il s'agit de la petite GTPase Rab5a. D'après les résultats de cette première expérience, Rab5a interagirait avec le mutant Tau-CT (Figure 8/C, p58).

Figure 7 : schéma des mutants de délétion de Tau

La protéine Tau a été schématisée sur la figure ci-contre. Le premier bloc représentait le domaine de projection de la protéine Tau, qui contenait donc le domaine riche en proline, précédé du domaine acide de Tau. Le second bloc qui contenait les 4 répétitions R1 à R4 correspondait au domaine de liaison aux MTs. Les mutants Tau-NT (1-213) et Tau-CT (214-441) ont été réalisés en divisant la protéine Tau en deux, au niveau de la région riche en proline. Le mutant Tau-CT contenait donc un fragment de la région riche en proline de Tau. Le mutant de DelMT-CTD (1-250) correspondait au domaine de projection seul. Les mutants DelMT234 (1-273), DelMT34 (1-304) et Del MT4 (1-335) correspondaient au domaine de projection de Tau auquel a été adjoint la répétition R1, les répétitions R1 et R2 ou les répétitions R1, R2 et R3 respectivement. Le mutant DelCTD (1-367) possédait le domaine de projection de Tau, les quatre répétitions R1 à R4, mais pas l'extrémité C-terminale de la protéine.

Domaine de liaison aux MTs

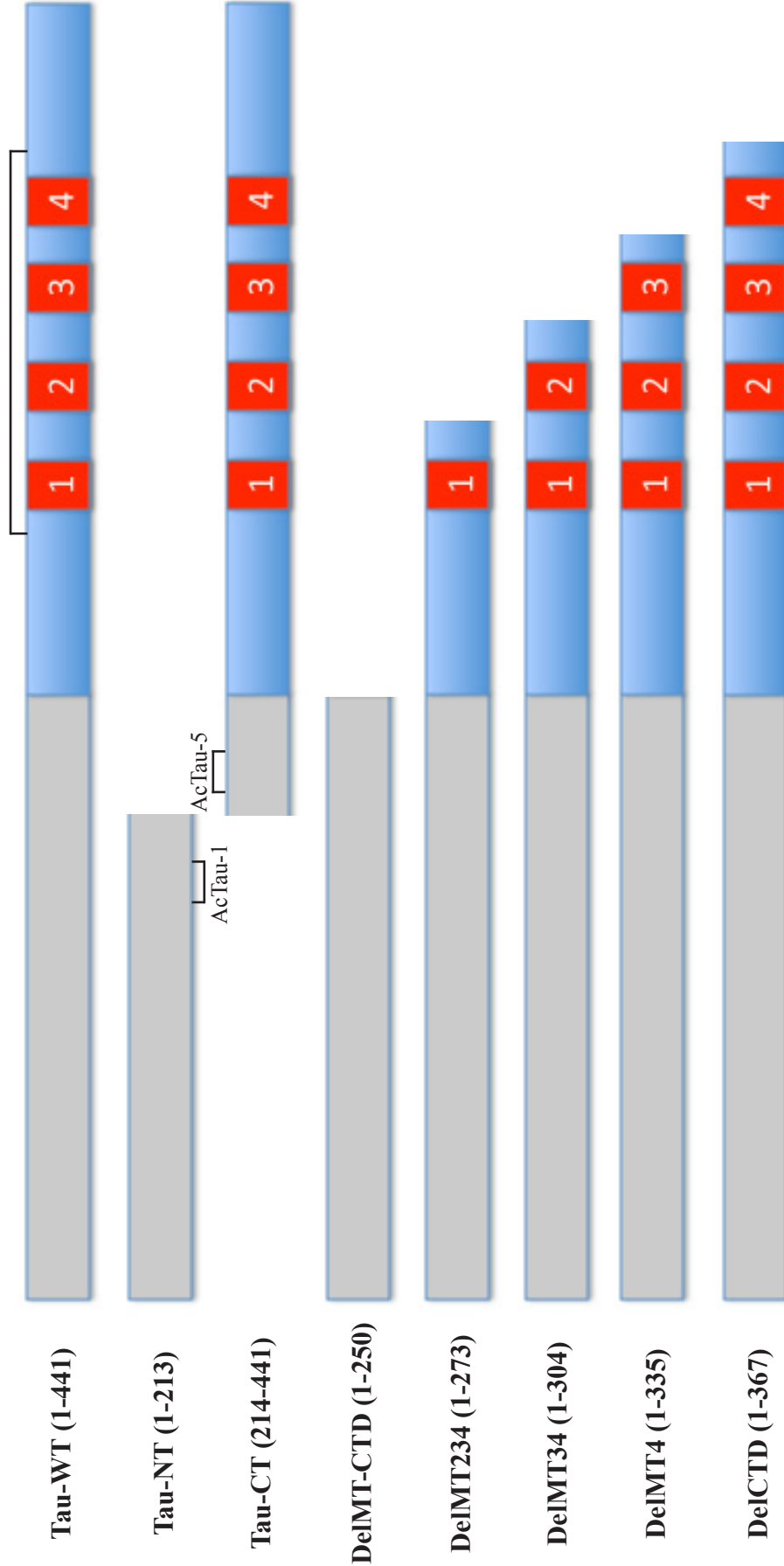


Figure 8 : la petite GTPase Rab5a, un nouvel interacteur pour Tau ?

La figure ci-après présente les résultats de recouvrement sur gel sur deux types d'échantillons : des microsomes totaux (mTs) d'un cerveau de rat adulte (2D), ou des protéines purifiées (1D). Les mTs ont été séparés sur gel d'acrylamide en deux dimensions, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées avec la Tau-WT (1-441) ou des fragments de Tau : Tau-NT (1-213) et Tau-CT (214-441). L'interaction de Tau ou des fragments de Tau avec les protéines des mTs a été révélée par immuno-buvardage avec les anticorps Tau-1 (épitope : 201-205) ou Tau-5 (épitope : 218-235). Les protéines interagissant avec Tau ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse. L'interaction a été confirmée avec des protéines purifiées qui ont été séparées sur gel d'acrylamide en une dimension, en utilisant la même technique de recouvrement sur gel.

A) La tubuline a interagi spécifiquement avec la Tau-WT et la Tau-CT, mais pas avec la Tau-NT.

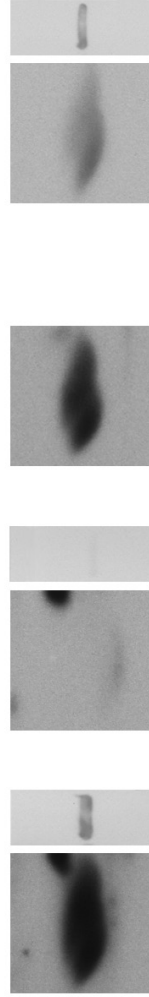
B) La chaîne légère des neurofilaments (NF-L) a interagi spécifiquement avec la Tau-WT et la Tau-NT, mais pas avec la Tau-CT.

C) Un nouvel interacteur potentiel pour Tau a été détecté avec la technique de recouvrement sur gel couplé à de la spectrométrie de masse. Il s'agit de la petite GTPase Rab5a, qui a interagi avec Tau-WT et Tau-CT, mais pas Tau-NT.

Recouvrement sur gel

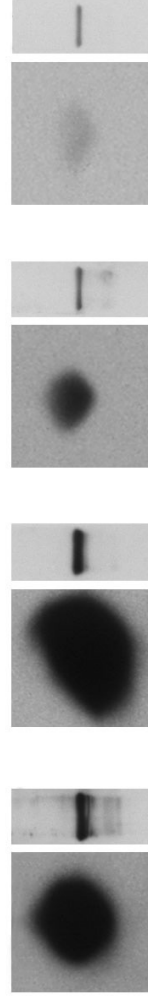
A)

+Tau		+Tau-NT		+Tau		+Tau-CT	
Ac Tau-1		Ac Tau-1		Ac Tau-5		Ac Tau-5	
2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D



Tubuline

B)



Neurofilament

C)



Rab5

3.2. Interaction de Rab5a avec la partie C-terminale de Tau *in vitro*

3.2.1. Confirmation de l'interaction de Tau-CT et Rab5a

Les résultats préliminaires, qui ont été obtenus par recouvrement sur gel sur des mTs de cerveau de rat adulte, nous ont suggéré une interaction directe entre la petite GTPase Rab5a et la partie C-terminale de Tau. Afin de confirmer cette interaction, un recouvrement sur gel a été réalisé avec des protéines humaines recombinantes purifiées. La Tau ou les fragments de Tau purifiés ont été séparés sur gel d'acrylamide, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Après blocage avec de la BSA, les membranes ont été incubées avec de la Rab5a recombinante. L'interaction de la Rab5a avec Tau ou ses fragments a été révélée avec un anticorps contre Rab5. La protéine Rab5a a interagi directement avec Tau-WT et Tau-CT, mais pas avec Tau-NT (Figure 9/A & 9/B, p62). Ces résultats ont confirmé l'interaction découverte précédemment, à savoir que Rab5a interagissait directement avec Tau-CT *in vitro*.

3.2.2. Détermination de la zone d'interaction

Nous avons ensuite utilisé des mutants de délétion de Tau, au niveau de la partie C-terminale, afin de déterminer plus précisément quelle partie de Tau interagissait avec Rab5a. Le mutant de délétion Tau-CT, dont on a démontré l'interaction avec Tau, comprenait le domaine d'interaction avec les MTs, soit les quatre répétitions R1 à R4, ainsi que la région C-terminale de la protéine (Figure 7, p56). Cinq mutants de délétion ont donc été construits à partir de Tau-WT, en enlevant progressivement ces régions. Le mutant DelCTD correspondait à la Tau-WT sans la région C-terminale, DelMT4 n'avait pas la

région C-terminale ainsi que la R4, DelMT34 n'avait pas la région C-terminale et les répétitions R3 et R4, DelMT234 n'avait pas la région C-terminale et les répétitions R2, R3 et R4, et enfin DelMT-CTD n'avait pas la région C-terminale et le domaine de liaison aux MTs (Figure 7, p56). Un recouvrement sur gel avec Rab5a a été réalisé de la même manière que pour Tau, Tau-NT et Tau-CT. Une interaction a été obtenue avec Rab5a pour les mutants DelMT234, DelMT34, DelMT4 et DelCTD, mais pas avec le mutant DelMT-CTD (Figure 9/B, p62). La suppression de la zone comprise entre les acides aminés 251 et 273 (R1) de Tau a conduit à une perte d'interaction avec Rab5a. La première répétition permettait donc l'interaction, mais n'était pas forcément la seule. De plus, l'interaction entre Rab5a et DelMT234 semblait plus faible qu'avec DelMT34 ou les autres mutants de Tau interagissant avec Rab5a (Figure 9/B, p62). Il était possible qu'une portion de Tau comprise entre les acides aminés 274 et 304 (R2) soit aussi nécessaire pour avoir une interaction complète. Les répétitions R3 et R4 ne semblaient pas avoir d'effet sur l'interaction entre Tau et Rab5a.

3.2.3.Mutants ponctuels des démences fronto-temporales

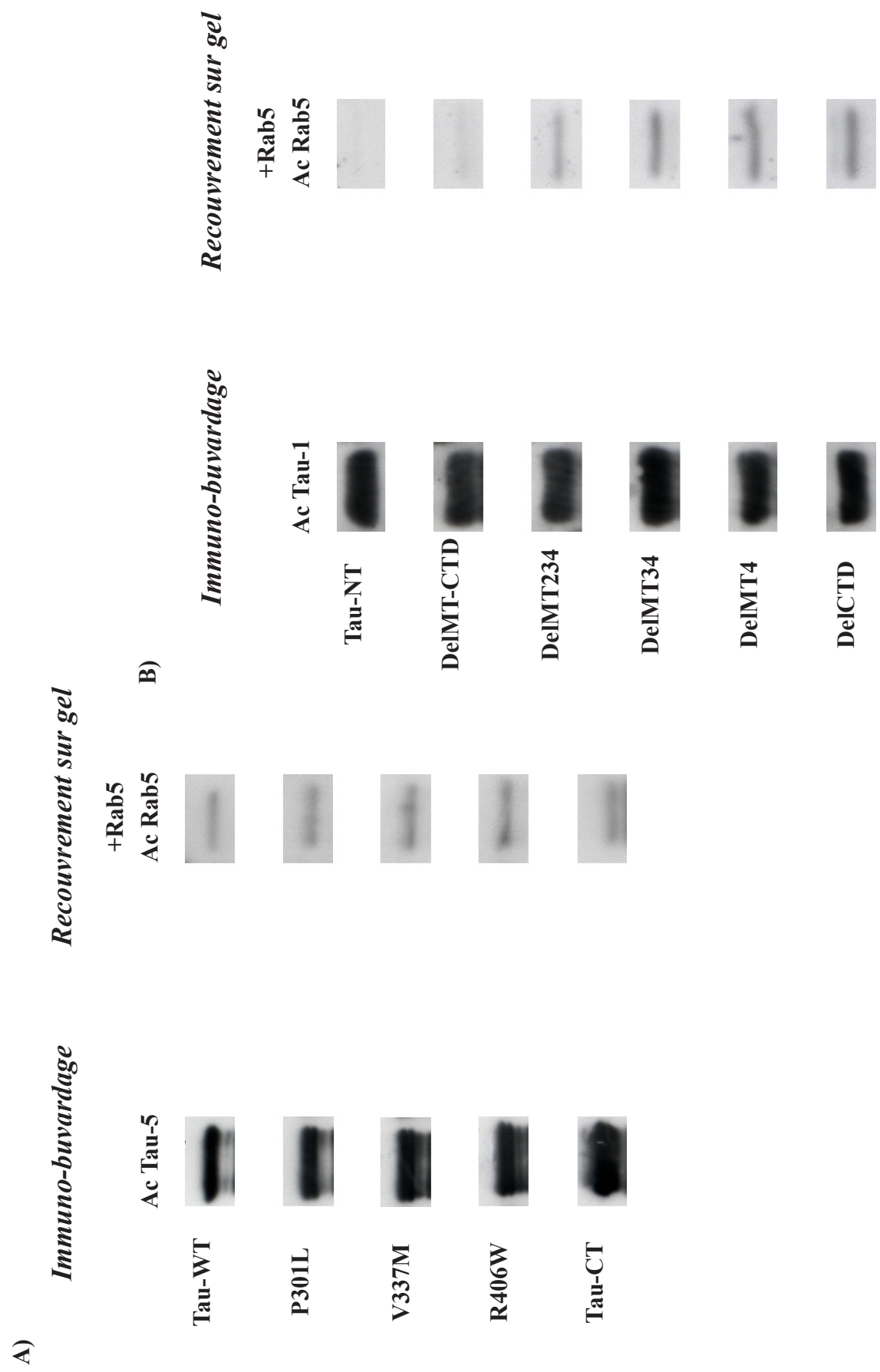
En plus des mutants de délétion de Tau, l'interaction entre Tau et Rab5a a été aussi testée sur des mutants ponctuels impliqués dans une tauopathie. Les mutants de Tau P301L, V337M et R406W sont impliqués dans la démence fronto-temporale FTDP-17, même si le lien entre les mutations et la neurodégénérescence n'est pas encore totalement compris. Les mutants de Tau P301L, V337M et R406W ont interagi avec Rab5a avec la même intensité que la Tau-WT (Figure 9/A, p62). Ces mutations dans la partie C-terminale de Tau n'ont donc pas perturbé l'interaction entre la Tau et la Rab5a.

Figure 9 : interaction de Tau et de mutants de Tau avec Rab5a *in vitro* en recouvrement sur gel

La protéine Rab5a ainsi que la Tau, les mutants de délétion ou les mutants ponctuels de Tau ont été extraits et purifiés des bactéries. Des quantités égales de chaque protéine ont été séparées sur gel d'acrylamide, puis transférées sur membrane de nitrocellulose. L'identité des différentes protéines a été vérifiée par immuno-buvardage avec un anticorps dirigé contre Tau, soit Tau-1 ou Tau-5. Une deuxième série de membranes avec la même quantité de protéines a été incubée avec de la Rab5a. La présence de Rab5a sur les membranes a été ensuite détectée avec un anticorps dirigé contre Rab5.

A) Une interaction avec la Rab5a a été détectée pour la Tau-WT, ainsi que la Tau-CT. De plus, les mutants ponctuels de Tau (P301L, V337M, R406W) impliqués dans la démence fronto-temporale (FTDP-17), n'ont pas présenté de différence d'interaction avec Rab5a par rapport à la Tau-WT.

B) La Tau-NT ainsi que le mutant de délétion DelMT-CTD n'ont pas interagi avec Rab5a. Les mutants DelCTD, DelMT4, DelMT34 et DelMT234 ont interagi avec Rab5a, bien que DelMT234 présentait une interaction légèrement plus faible que les autres.



3.3.Interaction spécifique de Tau avec Rab5

3.3.1.Interaction de Tau avec Rab5a et Rab5b *in vitro*

D'après les résultats précédents, Tau interagissait *in vitro* avec Rab5a. La question se posait si cette interaction était spécifique à Rab5a ou si Tau pouvait interagir avec les autres isoformes de Rab5, notamment la Rab5b qui est aussi exprimée dans les neurones (Arnett et al., 2004; Blaabjerg et al., 2003; de Hoop et al., 1994). En effet, les trois isoformes de Rab5 partagent une grande similarité de séquence et de structure (Bucci et al., 1995). Pour tester cette hypothèse, un recouvrement sur gel a été réalisé avec des protéines purifiées, de la Rab5a humaine, et de la Rab5b de souris (mRab5b). La Rab5b de souris et la Rab5b humaine ont été montrées homologues à 100% (Bucci et al., 1995). Les résultats obtenus ont montré une interaction aussi forte entre la mRab5b et Tau, qu'entre la Rab5a et Tau (Figure 10, p66). Donc, Tau a interagi directement *in vitro* avec les deux isoformes de Rab5 présentes dans les neurones.

3.3.2.Absence d'interaction de Tau avec Rab4 et Rab6

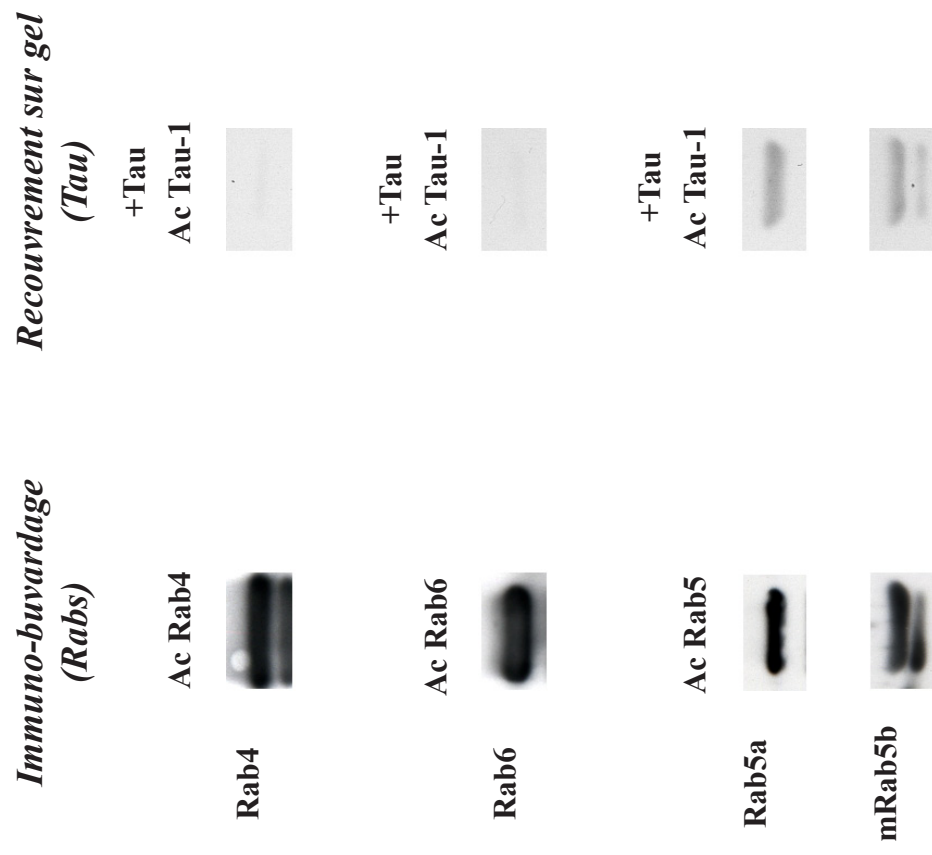
Tau a interagi directement avec les deux isoformes de Rab5 présentes dans les neurones, mais était-ce un mécanisme spécifique à Rab5 ou une interaction générale avec toutes les Rab-GTPases ? Pour répondre à cette question, un recouvrement sur gel a été réalisé avec deux autres protéines Rabs : la Rab4 qui est impliquée dans les endosomes de recyclage, et la Rab6, qui est impliquée dans le transport rétrograde de l'appareil de golgi jusqu'au réticulum endoplasmique. Ce recouvrement sur gel a été réalisé à partir des protéines humaines recombinantes. Alors qu'une interaction entre la Tau et la Rab5a, ainsi qu'entre la Tau et la mRab5b a été détectée, nous avons observé que la Tau n'interagissait

pas avec Rab4 et Rab6 (Figure 10, p66). Tau semblait être un interacteur spécifique à Rab5 et n'interagissait pas avec les autres Rabs-GTPases testées.

Figure 10 : interaction spécifique de Tau avec Rab5a et Rab5b *in vitro* en recouvrement sur gel

Les protéines recombinantes humaines Rab4, Rab6 et Rab5a, ainsi que la Rab5b de souris (mRab5b), ont été exprimées et purifiées des bactéries. Des quantités équivalentes de chacune de ces protéines ont été séparées sur gel d'acrylamide, puis transférées sur membrane de nitrocellulose. L'identité des différentes protéines a été contrôlée par immuno-buvardage avec des anticorps spécifiques contre Rab4, Rab5 et Rab6.

Une membrane a été réalisée en parallèle et utilisée pour un recouvrement sur gel avec la protéine Tau. L'interaction de Tau avec les différentes protéines a ensuite été vérifiée par immuno-buvardage avec l'anticorps Tau-1. Des signaux d'intensité égale ont été détectés pour la Rab5a et la mRab5b, indiquant que ces deux isoformes de Rab5 interagissaient avec une affinité similaire avec la Tau. Par contre, la Rab4 et la Rab6 n'interagissaient pas avec Tau.



3.4.Co-localisation de Tau et Rab5 sur une même population de vésicules

D'après les expériences précédentes, Tau et Rab5 interagissaient directement *in vitro*. Lors de son cycle *in vivo*, la Rab5 est soit liée à des membranes, comme les endosomes précoces et les vésicules à clathrine, soit dans le cytoplasme couplé à la REP ou à la RabGDI (Figure 5, p31). La question qui se posait donc à ce moment était de savoir si l'interaction entre Tau et Rab5 se produisait lorsque Rab5 était liée à des membranes ou était sous la forme de complexe protéique dans le cytoplasme.

3.4.1.Immuno-isolation à partir d'un homogénat de cerveau

Le but de cette expérience était de montrer que les protéines Tau et Rab5 co-localisaient sur une même population de vésicules. Une immuno-isolation a été réalisée à partir d'un homogénat d'un cerveau de rat adulte. Des billes magnétiques couplées à des anticorps contre Tau ont permis d'immuno-isoler des membranes contenant de la Tau (Figure 11/A, p71). Ces membranes contenaient de la protéine Rab5 qui a été détectée par immuno-buvardage (Figure 11/A, p71). Des billes magnétiques couplées à des anticorps contre Rab5 ont permis d'immuno-isoler des membranes contenant de la Rab5, mais la quantité de Tau présente sur ces membranes était trop faible pour être détectée. Ce résultat peut-être expliqué par la nature de l'échantillon utilisé, un homogénat total de cerveau. En effet, la Rab5 est présente à la fois dans les cellules gliales et les neurones, alors que la Tau est présente seulement dans les neurones. Il est donc probable que les membranes contenant à la fois la Tau et la Rab5 représentaient une faible proportion des membranes Rab5-

positives. Il était donc nécessaire d'enrichir notre échantillon en endosomes Rab5-positifs neuronaux.

3.4.2.Immuno-isolation à partir d'une fraction enrichie en endosomes Rab5-positifs neuronaux

Afin d'enrichir notre échantillon en endosomes Rab5 positifs neuronaux, nous avons préparé des synaptosomes. Les synaptosomes correspondent à la terminaison synaptique, c'est-à-dire la partie pré-synaptique neuronale ainsi que la terminaison post-synaptique (Figure 11/B, p71). Pour extraire les vésicules présentes dans ces synaptosomes, les membranes obtenues ont été soumises à un choc osmotique, sans détergent, afin de les ouvrir et de libérer leur contenu. Les vésicules ont ensuite été séparées du reste des composants membranaires afin d'obtenir une population enrichie en vésicules, qui contenaient des endosomes Rab5-positifs. Une immuno-isolation a été réalisée avec soit un anticorps contre la Rab5 ou contre la Tau. Les billes magnétiques couplées à un anticorps contre Tau ont permis d'isoler des vésicules possédant de la Rab5, et vice-versa (Figure 11/C, p71). Ces résultats ont montré que Tau et Rab5 co-localisent sur une même population de vésicules. Les billes magnétiques contrôles couplées à des anticorps non spécifiques de souris n'ont pas donné de signal pour Tau et Rab5. De plus, une immuno-isolation a été réalisée avec des billes couplées à un anticorps contre la clathrine sur les vésicules extraites des synaptosomes. En effet, Rab5 est impliquée dès le début de l'endocytose clathrine-dépendante, il était donc intéressant de vérifier si la clathrine immuno-isolait avec Tau. Les billes magnétiques couplées à un anticorps contre la clathrine ont permis d'isoler des vésicules qui contenaient la clathrine, la Tau et la Rab5 (Figure 11/C, p71). De plus, les immuno-isolations dirigées contre la Tau et la Rab5 ont aussi

permis d'isoler une quantité significative de clathrine, malgré un bruit de fond important (Figure 11/C, p71). D'après ces résultats, la Tau co-localise aussi avec une population de vésicules clathrine -positives.

3.4.3. Localisation de Tau et Rab5 dans les neurones

D'après les résultats précédents, Tau et Rab5 pourraient co-localiser sur deux types de populations de vésicules, à savoir les endosomes précoces et les vésicules à clathrine. Pour visualiser cette co-localisation en microscopie, nous avons transfecté des neurones primaires d'hippocampe de rats nouveau-nés en culture à la lipofectamine 2000, avec de la Rab5-mRFP et de la Tau-GFP. L'hippocampe constitue une source relativement homogène de neurones qui possèdent des propriétés typiques des neurones du SNC en général (Goslin et al., 1998). De plus, ces neurones développent *in vitro* un compartiment somato-dendritique et un compartiment axonal (Dotti and Banker, 1987; Dotti et al., 1988; Goslin and Banker, 1989).

Au microscope confocal, l'axone des neurones doublement transfectés présentait un marquage uniforme pour Tau dans tout l'axone, diminuant légèrement plus on s'éloignait du corps cellulaire (Figure 12/A & 12/B, p73). Le marquage pour Rab5 était ponctiforme dans les dendrites et dans l'axone. Ces expériences de microscopie ne nous permettent pas d'affirmer que Tau et Rab5 co-localisent *in-vivo*, sachant que n'importe quelle protéine axonale autre que Tau aurait vraisemblablement donné le même résultat. Par contre, nous avons montré que nos deux constructions protéiques couplées à des -tag fluorescent permettaient l'expression de Tau et de Rab5 dans un même compartiment.

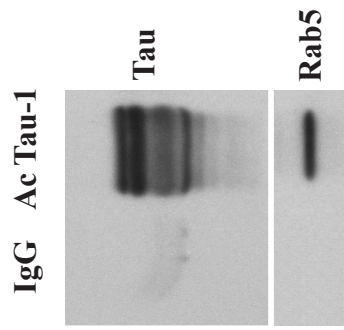
Figure 11 : co-localisation de Tau et Rab5 sur une même population de vésicules *in vivo*

A) Une immuno-isolation a été réalisée sur un homogénat total d'un cerveau de rat. Des billes magnétiques ont été couplées à des anticorps de souris non spécifiques (IgG) ou à un anticorps contre Tau (Tau-1). Cette expérience a permis d'immuno-isoler des membranes qui contiennent la protéine Tau ainsi que la Rab5.

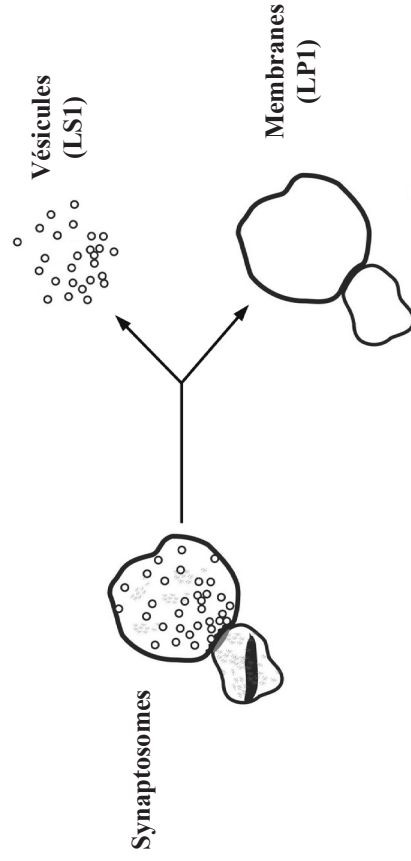
B) Les synaptosomes correspondent aux terminaisons synaptiques, avec la terminaison neuronale pré-synaptique et la terminaison post-synaptique. Ces éléments membranaires ont été soumis à un choc osmotique à l'HEPES, ce qui a provoqué leur ouverture et le relâchement des vésicules des synaptosomes. Les membranes ont été sédimentées sur gradient de sucrose (LP1) et nous avons obtenu un pool enrichi en vésicules (LS1).

C) Une immuno-isolation a été réalisée à partir de ce LS1 provenant des synaptosomes, avec des billes magnétiques couplées à des anticorps de souris non spécifiques (IgG(M)) ou contre Tau (Tau-1), Rab5 et la clathrine. Chacun des anticorps mentionné a permis d'isoler la protéine correspondante : la Tau, la Rab5 et la clathrine, respectivement. De plus, chacun de ces anticorps a aussi permis d'isoler les deux autres protéines.

A)
Immuno-isolation
(homogénat de cerveau de rat)



B)
Enrichissement en vésicules Rab5 positives :
préparation de synaptosomes



C)
Immuno-isolation
(LS1 de cerveau de souris)

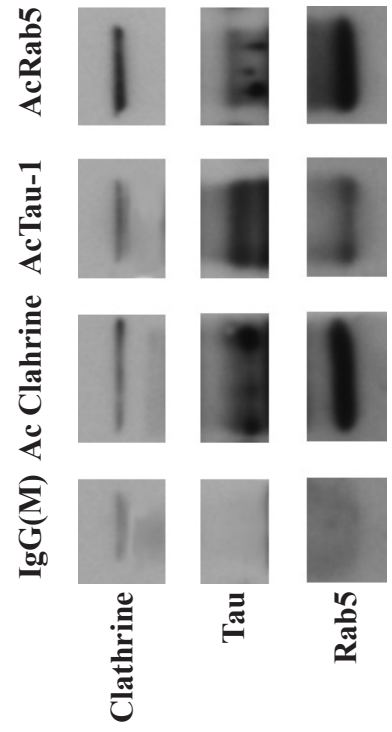
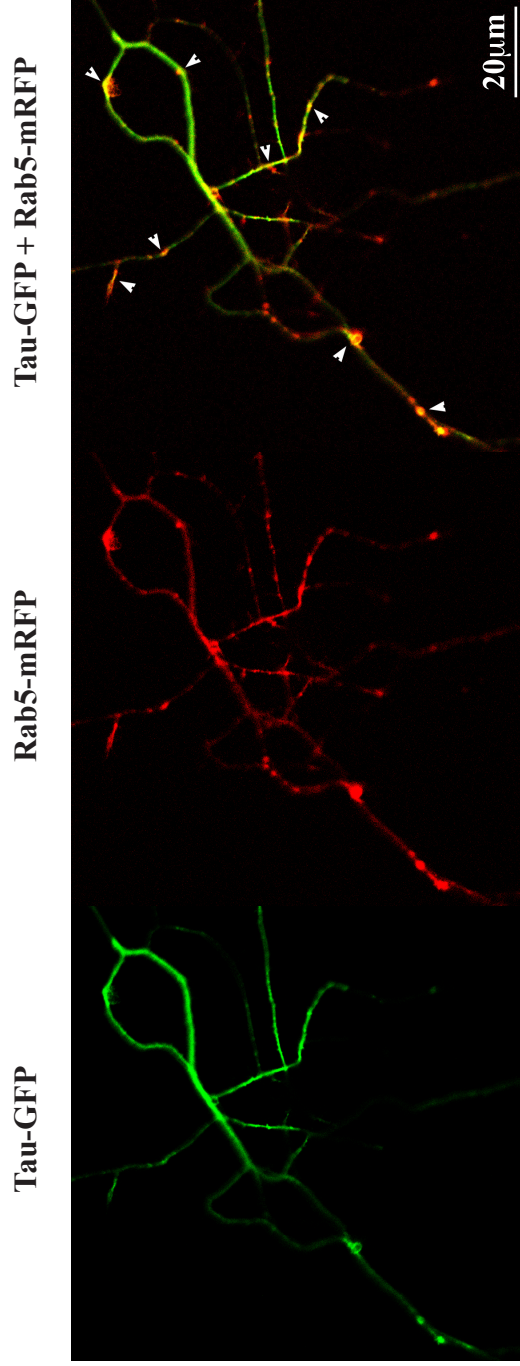


Figure 12 : localisation de Tau et Rab5 *in vivo* dans des neurones primaires de l'hippocampe

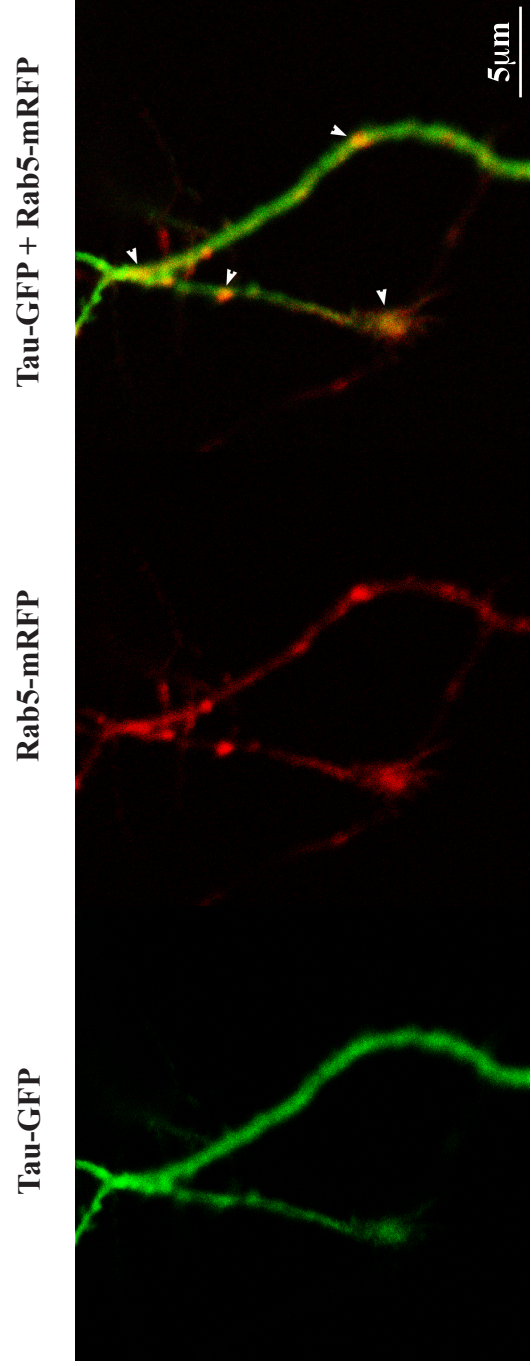
A) Des neurones d'hippocampe d'embryons de rats en culture ont été transfectés avec de la Rab5-mRFP et de la Tau-GFP. Les neurones doublement transfectés présentaient un marquage uniforme pour la GFP, diminuant légèrement dans l'axone plus on s'éloigne du corps cellulaire. Le marquage pour la mRFP était ponctiforme dans les dendrites et dans l'axone de ces neurones. Certaines structures ont été mises ici en évidence par des pointes de flèches blanches.

B) Un grossissement supérieur a été réalisé sur la seconde partie de la figure, il nous a permis de mieux visualiser ces structures. Des structures Rab5-positives ont été mises en évidence par des pointes de flèches blanches.

A)



B)



3.5.Effet de la sur-expression de Tau sur Rab5 in vivo

Nos résultats ont permis de mettre en évidence des structures Rab5-positives au contact de la protéine Tau dans les axones des neurones. Or, un des rôles principaux de Tau est de se lier aux éléments du cytosquelette, tels que les MTs (Buee et al., 2000). De plus, des études ont montré que Tau jouait un rôle dans le transport axonal (Dixit et al., 2008; Dubey et al., 2008; Seitz et al., 2002; Stamer et al., 2002; Vershinin et al., 2007). La question se posait donc de savoir si les rôles déjà connus de Tau pouvaient être reliés à la nouvelle interaction de Tau avec Rab5. Nous avons donc utilisé deux modèles expérimentaux pour répondre à cette question, des cultures de neurones sur-exprimant la Tau et des souris transgéniques sur-exprimant une forme mutante de Tau (P301L).

3.5.1.Sur-expression de Tau dans des neurones primaires de l'hippocampe

3.5.1.1.Méthodologie employée

Des neurones d'hippocampe d'embryons de rats en culture ont été transfectés à la lipofectamine 2000 avec de la Rab5-mRFP et de la Tau-GFP ou de la Rab5-mRFP et un vecteur contrôle GFP. Le vecteur contrôle qui a été utilisé était soit le tag fluorescent GFP seul (Ctrl) (Figure 13, p78) ou de la Tau-NT-GFP (NT) (Figure 14, p80). D'après les résultats de nos expériences *in vitro*, la Tau-NT n'interagissait pas avec la Rab5 (Figure 9/B, p62). Donc, la Tau-NT-GFP était un bon contrôle par rapport à la Tau-GFP pour transfecter les neurones primaires de l'hippocampe. Des tronçons d'axone doublement transfectés et représentatifs des neurones Tau et contrôle ont été sélectionnés et présentés sur la figure ci-contre (Figure 13, p78).

Le contenu en organelles n'étant pas uniforme le long de l'axone des neurones surtout dans les parties distales (près de la terminaison axonale) et proximales (près du corps cellulaire), chaque axone analysé a été divisé en neuf portions distinctes de tailles égales. Dans chacune des populations, soit les neurones Tau ou contrôle, le nombre de structures Rab5-positives par micromètre (μm) d'axone a été comptabilisé (Figure 14/A et 14/B, p80). De plus, nous avons mesuré la surface fluorescente pour la Rab5-mRFP par micromètre (μm) d'axone, ce qui correspondait à une mesure semi-quantitative de la quantité de protéine fluorescente exprimée (Figure 14/C et 14/D, p80).

3.5.1.2.Distribution des structures Rab5-positives dans l'axone

Dans les axones transfectés avec Tau ou avec le contrôle Tau-NT, on a observé des structures Rab5-positives tout du long de l'axone (Figure 14/A, p80). En regardant les chiffres relatifs, c'est-à-dire le pourcentage de vésicules Rab5-positives par portion par rapport au total, nous avons remarqué que la distribution des vésicules était identique entre les neurones transfectés avec la Tau ou le contrôle Tau-NT (Figure 14/B, p80). Ces résultats nous indiquaient que la sur-expression de la Tau n'empêchait pas le transport dans l'axone dans notre modèle expérimental, contrairement à ce que l'on pouvait s'attendre.

3.5.1.3.Quantification des structures Rab5-positives dans l'axone

Cependant, les axones transfectés avec la Tau possédaient environ deux fois plus de structures Rab5-positives par rapport au contrôle Tau-NT (Figure 13, p78 & Figure 14/A, p80). Cette augmentation du nombre de structures Rab5-positives correspondait à une augmentation du niveau de protéine fluorescente Rab5, dans les neurones transfectés avec

la Tau. En effet, les mesures de surface de fluorescence pour la Rab5-mRFP ont donné des résultats toujours beaucoup plus élevés pour les neurones transfectés avec la Tau. (Figure 14/C, p80). L'augmentation du nombre de structures Rab5-positives pour les axones transfectés avec la Tau pouvait s'expliquer simplement par l'augmentation de la quantité de protéine Rab5 fluorescente détectée, plutôt que par un effet de Tau sur les structures Rab5-positives.

3.5.1.4. Distribution de la surface fluorescente pour la Rab5-mRFP dans l'axone

La distribution des structures Rab5-positives était identique dans les neurones transfectés avec la Tau ou le contrôle Tau-NT (Figure 14/B, p80). Par contre, nous avons constaté une différence entre les deux populations au niveau de la distribution de la surface fluorescente pour la Rab5-mRFP. En effet, au niveau proximal, le pourcentage de fluorescence par rapport au total était identique pour les neurones transfectés avec la Tau ou avec le contrôle Tau-NT (Figure 14/D, p80). Mais, pour les neurones transfectés avec la Tau, on remarquait une forte diminution de la surface de fluorescence, au niveau des segments d'axone suivants. Enfin, à l'extrémité distale de l'axone, on remarquait que proportionnellement, on avait une diminution du pourcentage de surface fluorescente pour la Rab5-mRFP dans les neurones transfectés avec la Tau. La sur-expression de la Tau dans les axones a donc induit une modification de la distribution de surface de fluorescence pour la Rab5-mRFP.

Figure 13 : sur-expression de Tau dans des neurones primaires de l'hippocampe

Des neurones primaires de l'hippocampe de rat en culture ont été transfectés avec de la Tau-GFP et de la Rab5-mRFP, ou un vecteur contrôle GFP et de la Rab5-mRFP. Au niveau de tronçons d'axones de neurones doublement transfectés, un marquage uniforme a été observé pour la Tau-GFP (Tau) et le vecteur contrôle GFP (Ctrl). Dans les mêmes tronçons d'axone, le marquage pour la Rab5-mRFP (Rab5) était ponctiforme. Les axones transfectés avec le vecteur contrôle GFP présentaient moins de structures Rab5-positives par rapport à ceux transfectés avec la Tau-GFP. Les tronçons d'axones qui ont été présentés sur la figure ci-après étaient représentatifs des deux populations de neurones.

Axones de neurones doublement transfectés

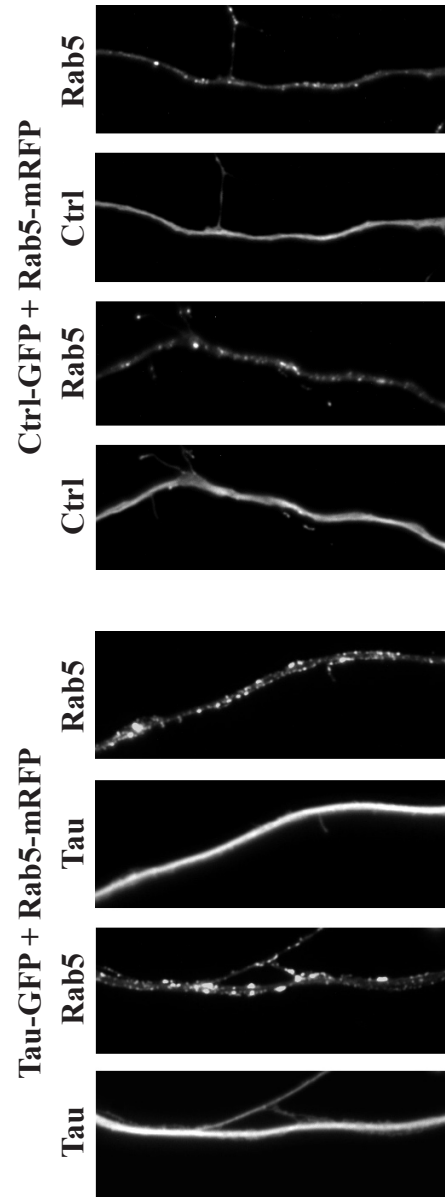


Figure 14 : analyse quantitative de la sur-expression de Tau sur la distribution des structures Rab5-positives dans des neurones primaires de l'hippocampe

Des neurones ont été transfectés avec la Rab5-mRFP et la Tau-GFP (TAU) ou la Rab5-mRFP et la Tau-NT-GFP (NT). Les axones de neurones doublements transfectés ont été divisés en neuf portions égales, la portion 1 était la plus proche du corps cellulaire, alors que la portion 9 incluait la terminaison axonale. Pour chaque neurone analysé (NT, n=25 ; TAU, n=32), deux mesures ont été réalisées pour chaque portion : le nombre de structures Rab5-positives en fonction de longueur d'axone, ainsi que la surface fluorescente pour la Rab5-mRFP en fonction de la longueur d'axone.

A) Cet histogramme représente le nombre de structures Rab5-positives en fonction de la longueur d'axone, en unité par μm ($\text{U}/\mu\text{m}$).

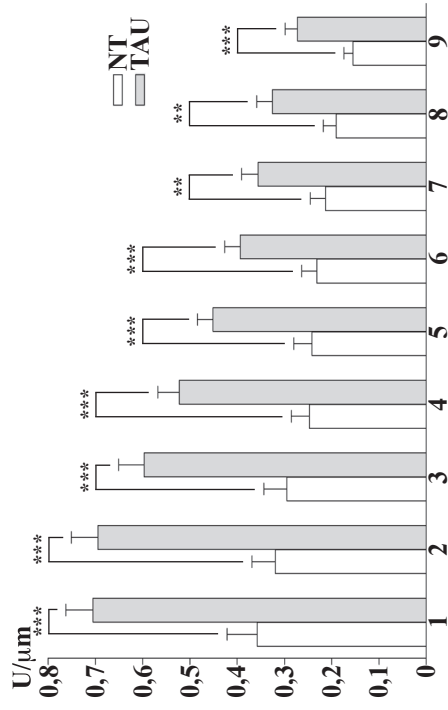
B) La quantité de structures Rab5-positives pour chaque tronçon a été convertie en pourcentage par rapport au nombre total de structures Rab5-positives dans l'axone.

C) Cet histogramme représente la surface fluorescente pour la Rab5-mRFP en fonction de la longueur d'axone ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).

D) De même que pour le nombre de structures Rab5-positives, nous avons calculé le pourcentage de surface fluorescente pour la Rab5-mRFP par rapport au total (%).

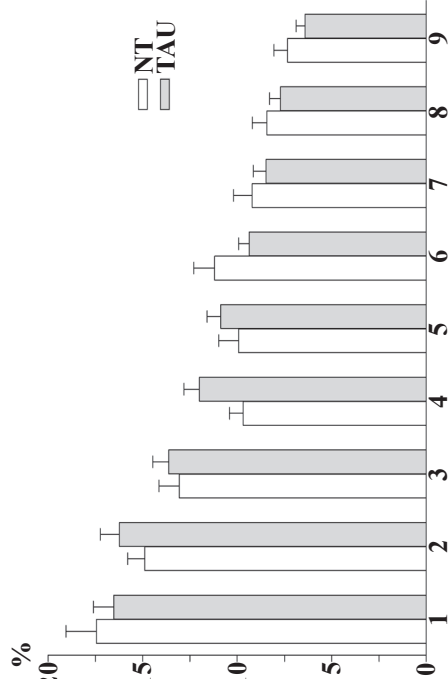
A)

Nombre de structures Rab5-positives par μm d'axone



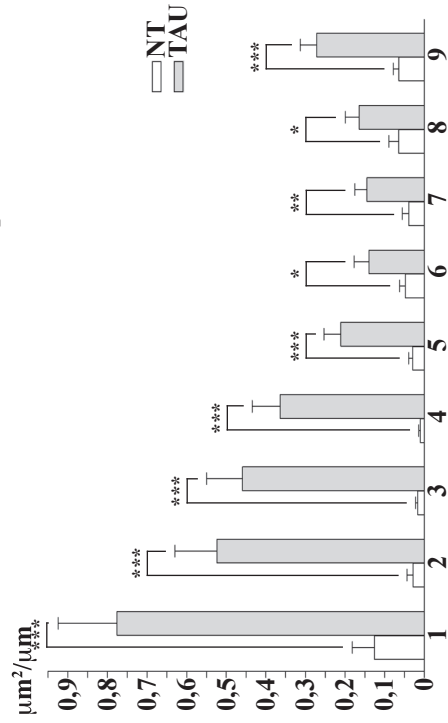
B)

Pourcentage de structures Rab5-positives par m d'axone



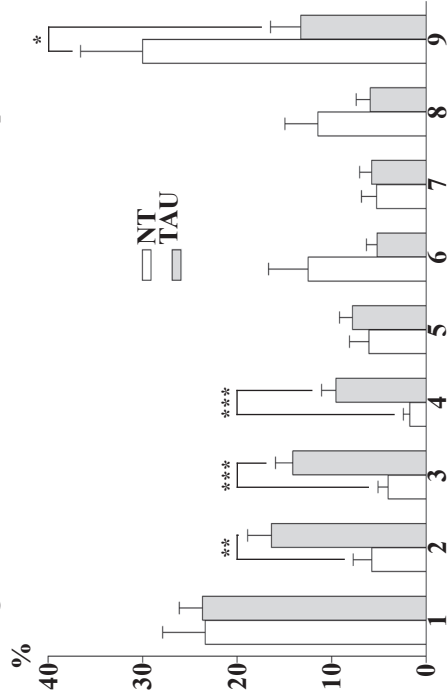
C)

Surface de fluorescence Rab5-mRFP par m d'axone



D)

Pourcentage de surface de fluorescence Rab5-mRFP par m d'axone



3.5.2. Sur-expression de la Tau P301L chez des souris JNPL3

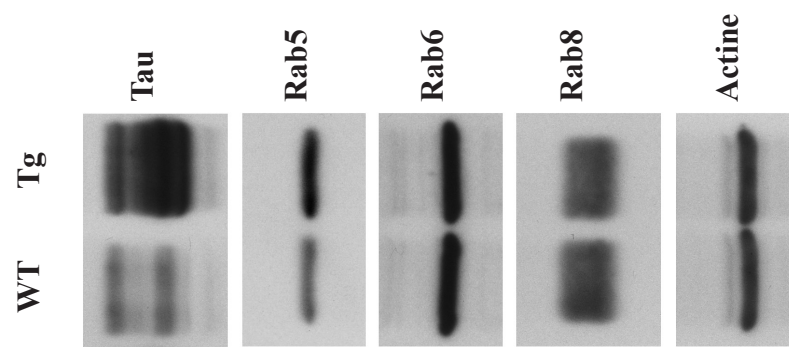
Afin de déterminer si la sur-expression de Tau pouvait avoir un effet sur Rab5 *in vivo*, nous avons utilisé un modèle de souris transgéniques disponible au laboratoire. Les souris transgéniques JNPL3 sur-expriment la Tau humaine mutante (P301L) impliquée dans la démence fronto-temporale FTDP-17. On retrouve chez ces souris de la Tau hyperphosphorylée dans les motoneurones de la moelle-épinrière. Ce modèle de souris transgénique nous a permis de tester si l'augmentation de l'expression de Tau *in vivo* avait une influence sur l'expression de Rab5 et d'autres Rab-GTPases.

Les protéines de la moelle-épinrière des souris JNPL3 (Tg) et de souris contrôles (WT) ont été extraites et séparées sur gel d'acrylamide, puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Nous avons testés par immuno-buvardage le niveau de la protéine Tau ainsi que de différentes Rabs GTPases : la Rab6 et la Rab8, qui est impliquée dans l'exocytose de vésicules provenant de l'appareil de golgi. Nous avons observé une augmentation importante du niveau de la Tau chez les souris JNPL3 (Tg) par rapport aux souris contrôle (WT) (Figure 15, p83). De plus, le niveau de la Rab5 était aussi augmenté chez les souris JNPL3 (Tg) par rapport aux souris contrôles (WT) (Figure 15, p83). Les niveaux de Rab6 et de Rab8 étaient similaires chez les souris JNPL3 (Tg) par rapport aux souris contrôles (WT) (Figure 15, p83). La sur-expression de la Tau humaine mutante P301L dans la moelle-épinrière chez les souris JNPL3 a induit une augmentation du niveau de Rab5, mais pas de Rab6 et Rab8.

Figure 15 : augmentation du niveau de Rab5 *in vivo* chez les souris sur-exprimant la Tau-P301L humaine

Les souris transgéniques JNPL3 (Tg) sur-expriment une forme mutante de Tau humaine (P301L) dans les motoneurones de la moelle-épineière. Une quantité équivalente d'extraits de moelle-épineière de ces souris JNPL3 (Tg), ou de souris contrôles (WT), ont été séparés sur gel d'acrylamide, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Les niveaux d'actine étaient similaires chez les deux types de souris, ce qui indiquait que la quantité de protéines dans les échantillons était similaire. Le niveau des protéines Tau, Rab5, Rab6 et Rab8 a été révélé par immuno-buvardage. Nous avons constaté une augmentation du niveau de Tau et de Rab5 chez les souris JNPL3 (Tg), alors que les niveaux de Rab6 et de Rab8 étaient similaires.

Immuno-buvardage
(Extraits de Moelle épinière)



3.6. Interaction préférentielle de Tau avec la Rab5 liée au GTP

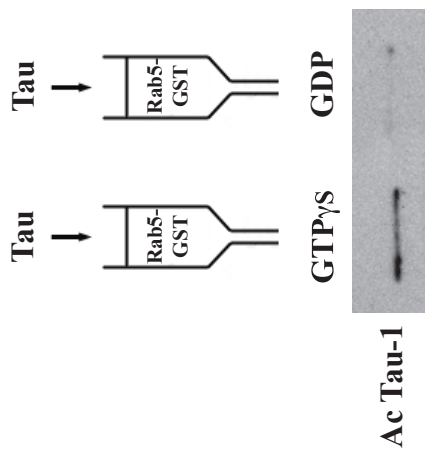
Nous avons montré que Tau et Rab5 interagissaient directement *in vitro*, et co-localisaient sur une même population de vésicules. Or, lorsque les Rabs sont attachées à des membranes, elles sont soumises à un cycle d'activation/inactivation et sont soit liées au GDP ou au GTP (Figure 5, p31). Les différents types d'interacteurs intervenant dans le cycle des Rabs ont une affinité privilégiée pour les Rabs liées soit au GDP ou au GTP. Les GEF interagissent préférentiellement avec les Rabs liées au GDP, alors que les effecteurs et les GAP interagissent préférentiellement avec les Rabs liées au GTP. Nous avons donc testé si Tau avait une interaction préférentielle avec la Rab5 liée au GDP ou au GTP.

Deux colonnes de résine *Gluthatione Sepharose* ont été chargées avec la protéine recombinante humaine Rab5a, possédant un tag -GST. La première colonne a ensuite été saturée avec du GTP γ S, un analogue non hydrolysable du GTP. La seconde colonne a été saturée avec du GDP. Des quantités égales de protéine Tau ont ensuite été chargées sur les deux colonnes. La Tau piégée a été éluée en chargeant les colonnes avec le nucléotide opposé : du GDP pour la colonne chargée en GTP γ S et du GTP pour la colonne chargée en GDP. Les éluats ont été séparés sur gel d'acrylamide, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. La quantité de Tau éluée a été détectée par immuno-buvardage. Nous avons observé que la Tau a interagi, avec les deux formes de Rab5, que ce soit celle chargée en GTP γ S ou en GDP, toutefois une quantité plus importante a interagi avec la Rab5 chargée en GTP γ S (Figure 16, p86). La Tau avait donc une plus grande affinité pour la Rab5-GTP, et donc la Tau était soit un effecteur ou une GAP pour Rab5.

Figure 16 : interaction préférentielle de Tau avec Rab5-GTP

Deux colonnes de résine *Gluthatione Sepharose* ont été chargées avec de la Rab5a humaine possédant un tag –GST. Les colonnes ont ensuite été saturées avec une solution contenant un nucléotide, soit du GTP γ S ou du GDP. Le GTP γ S est un analogue non hydrolysable du GTP. Des quantités égales de protéine Tau humaine purifiée ont ensuite été chargées sur les deux colonnes. Après plusieurs lavages, la protéine Tau piégée sur les colonnes a été éluée. La quantité de protéine Tau éluée a été analysée par immunobuvardage avec l'anticorps Tau-1.

Si Tau interagissait préférentiellement avec une forme de Rab5 liée à un nucléotide, elle devait rester piégée en plus grande quantité et donc être éluée en plus grande quantité. De la Tau a interagi avec les deux formes de Rab5, qu'elle soit liée au GDP ou au GTP γ S. Par contre, la quantité de Tau qui a interagi avec la Rab5 liée au GTP γ S était plus importante.



3.7.Détection de l'effet GAP de Tau envers Rab5

Les protéines interagissant préférentiellement avec la forme GTP des Rabs sont soit des effecteurs, soit des GAPs. Nous avons donc testé ici si Tau pouvait être une GAP pour la petite GTPase Rab5. La protéine Rab5 liée à du GTP radiomarqué a été mise en présence de quantités croissantes de Tau. La quantité de GDP produite a ensuite été analysée par chromatographie sur couche mince (TLC). Les résultats obtenus ont montré que plus on rajoutait de la Tau en présence de la Rab5, plus on obtenait de GDP produit (Figure 17/A & 17/B, p89). Ce résultat traduisait un effet GAP de la Tau envers Rab5. De plus, nous avons testés de la protéine Tau extraite de cerveaux de bœuf, qui est naturellement phosphorylée, ce qui n'est pas le cas des protéines produites dans les bactéries. Les résultats indiquaient qu'il n'y avait pas de différence d'effet GAP entre la Tau naturellement phosphorylée et la Tau non-phosphorylée (Figure 17/D, p89). Pour une concentration fixe, on a remarqué que la Tau et le mutant Tau-CT produisaient un effet GAP sur Rab5, par rapport à la Rab5 seule (Figure 17/C, p89). Par contre, le mutant Tau-NT n'avait pas d'effet GAP sur la Rab5 (Figure 17/C, p89). La protéine Tau semblerait donc avoir un effet GAP envers Rab5.

Figure 17 : mesure de l'activité GAP de Tau sur Rab5

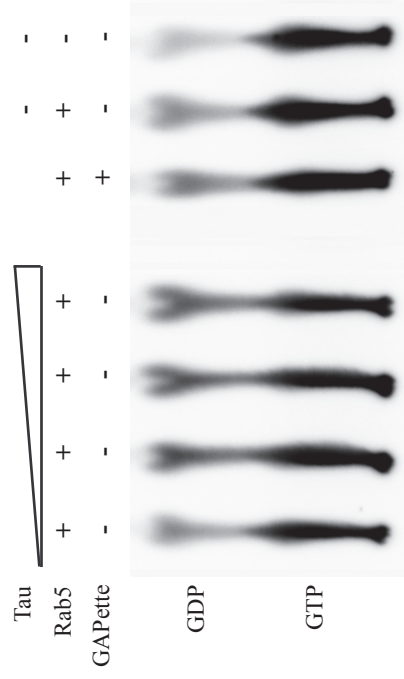
A) Exemple de chromatographie sur couche mince de nucléotides radiomarqués. On retrouve le GTP en bas et le GDP produit au dessus. La quantification de la quantité de GDP produite en présence de Tau, comparé à la quantité produite par la Rab5 seule permet de calculer le taux d'effet GAP. Des quantités croissantes de Tau ont été testées, ainsi que plusieurs contrôles afin de valider la technique (Rab5 + GAPette, Rab5 seul et GTP seul).

B) Mesure de l'activité GAP de la Tau envers la Rab5, à un temps donné, en fonction de quantités croissante de Tau. L'hydrolyse intrinsèque du GTP par la Rab5 seule a été rapportée à 1.

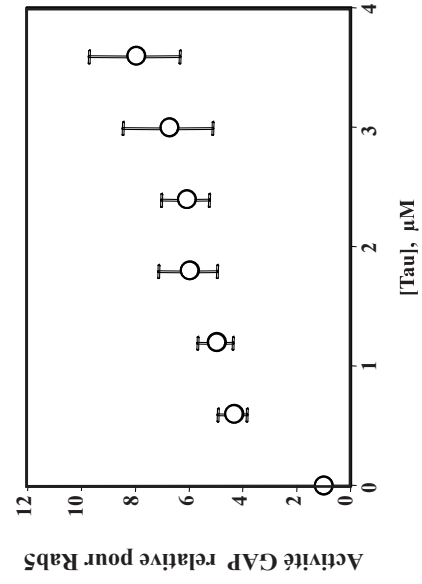
C) Comparaison de l'activité GAP de la Tau, à un temps et une concentration de protéine donnée, pour la Tau-WT et les mutants de délétion Tau-NT et Tau-CT, par rapport à la Rab5 seule.

D) Mesures de l'activité GAP de la Tau humaine envers la Rab5, à un temps donné, en fonction de quantités croissante de Tau. Sur ce graphique ont aussi été rapporté l'activité GAP des mutants ponctuels de Tau P301L, V337M et R406W, ainsi que de la Tau bovine.

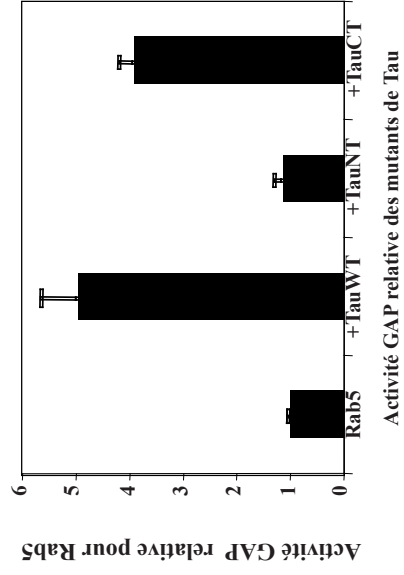
A)



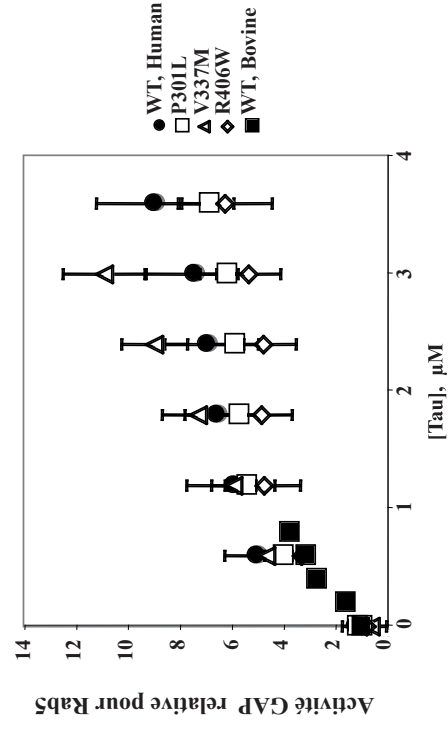
B)



C)



D)



4.DISCUSSION

4.1.Résumé des résultats

Nous avons démontré que la Rab5 interagissait *in vitro* avec une région de Tau comprise dans le mutant Tau-CT (214-441), en utilisant une technique de recouvrement sur gel. Les répétitions R1 et R2 du domaine de liaison aux MTs de Tau ont permis l'interaction. Les mutations de Tau P301L, V337M et R406W, impliquées dans la FTD-17, ne semblaient pas influencer l'interaction entre la Tau et Rab5a. La protéine Tau interagissait aussi avec la Rab5b, mais n'interagissait pas avec d'autres GTPases testées.

De plus, des expériences d'immuno-isolation ont montré que la Tau, la Rab5 et la clathrine co-localisaient sur une même population de vésicules *in vivo*. Des neurones primaires de l'hippocampe transfectés avec la Tau-GFP et la Rab5-mRFP, montraient une co-localisation partielle des deux protéines dans les axones des neurones.

La sur-expression de Tau dans des axones de neurones nous a amené à plusieurs remarques : (1)-La sur-expression de la Tau n'a pas affecté la distribution des structures Rab5-positives dans l'axone ; (2)-Nous avons observé une augmentation du nombre de structures Rab5-positives dans les axones où la Tau est sur-exprimée. Toutefois, cette augmentation était corrélée à une augmentation du niveau de transfection avec Rab5 dans ces neurones et ne semblait donc pas être un effet direct de la sur-expression de Tau ; (3)- Dans les axones sur-exprimant la Tau, la Rab5-mRFP avait une distribution inversée.

Des souris transgéniques sur-exprimant la Tau humaine mutante P301L présentaient une augmentation du niveau de protéine Rab5, mais pas avec d'autres GTPases testées.

La Tau avait une plus grande affinité *in vitro* pour la Rab5 chargée en GTP par rapport à la Rab5 chargée en GDP. La Tau semblait donc être soit un effecteur, soit une GAP pour Rab5. Des résultats préliminaires nous laissent penser que Tau aurait un effet GAP envers Rab5.

4.2.Détection d'un nouvel interacteur pour Tau : la petite GTPase Rab5

La protéine Tau était connue de longue date comme interagissant entre autre avec des éléments du cytosquelette, tels que les MTs (Buee et al., 2000). Des études récentes effectuées dans notre laboratoire ont montré que Tau interagissait avec différentes organelles, telles que l'appareil de Golgi (Farah et al., 2006; Liazoghli et al., 2005) ou le réticulum endoplasmique et les mitochondries (Perreault et al., 2009). Nous avons donc cherché à mettre en évidence d'autres interacteurs pour la protéine Tau.

4.2.1.Interaction directe de Tau et Rab5 *in vitro*

4.2.1.1.Recherche d'un nouvel interacteur pour Tau

La technique de recouvrement sur gel couplée à de la spectrométrie de masse a été utilisée dans cette étude pour détecter de nouveaux interacteurs pour Tau. Cette technique de recouvrement sur gel a déjà été utilisée par d'autres chercheurs pour mettre en évidence des interactions protéine-protéine (Hall, 2004; Sgarra et al., 2005). L'utilisation de cette technique sur des microsomes totaux de cerveau de rat adulte a permis de révéler des interacteurs connus de Tau, à savoir la tubuline et la chaîne légère des NFs (Figure 8, p58). En effet, la tubuline interagit directement avec Tau-CT (Cleveland et al., 1977; Serrano et al., 1985; Weingarten et al., 1975) et les NFs interagissent directement avec Tau-NT (Aamodt and Williams, 1984; Heimann et al., 1985; Leterrier et al., 1982). L'interaction entre la tubuline et la Tau, ou les NFs et la Tau a été confirmée avec la même technique de recouvrement sur gel sur des protéines recombinantes humaines purifiées (Figure 8, p58),

ce qui a validé notre approche de détection d'interacteurs. Nous avons ainsi mis en évidence un nouvel interacteur potentiel pour la Tau, la petite GTPase Rab5a, qui interagissait avec Tau-CT (Figure 8, p58). La protéine Rab5 est impliquée dans l'endocytose clathrine dépendante au niveau de la membrane plasmique, ainsi que dans la formation et la fusion des endosomes précoces (Bucci et al., 1992; Gorvel et al., 1991). Cette nouvelle interaction de Tau avec Rab5a nous suggérait un rôle de Tau dans l'endocytose précoce.

4.2.1.2. Confirmation de l'interaction entre Tau et Rab5

L'interaction entre Tau et Rab5a a été confirmée *in vitro* avec des protéines recombinantes humaines purifiées. La Rab5a a interagi directement avec la Tau-CT, mais pas avec Tau-NT (Figure 9/A et 9/B, p62). Nous avons aussi testé par recouvrement sur gel si Tau était capable d'interagir avec une autre isoforme de Rab5 présente dans les neurones, la Rab5b (de Hoop, 1994 ; Blabjerg, 2003 ; Arnett, 2004). En effet, des études ont montré que certaines voies d'endocytose impliquaient une seule isoforme de Rab5, pas les autres (Barbieri et al., 2000; Ulrich et al., 2005). Nos résultats ont montré que Tau interagissait directement *in vitro* avec les deux isoformes de Rab5, Rab5a et Rab5b (Figure 10, p66). Donc à priori, l'interaction entre Tau et Rab5 peut se produire dans le cadre des voies d'endocytose impliquant la Rab5a et la Rab5b. Cependant, l'expérience de recouvrement sur gel couplée à de la spectrométrie de masse sur des mTs d'un cerveau de rat adulte nous avait permis de détecter la Rab5a comme interagissant avec la Tau, mais pas la Rab5b. Or, les isoformes de Rab5 sont phosphorylées différemment *in vivo*, ce qui régule leurs interactions (Chiariello et al., 1999). Dans les expériences de recouvrement sur gel, les protéines contenues dans les mTs étaient naturellement phosphorylées, alors qu'elles ne l'étaient pas pour les protéines purifiées produites dans les bactéries. Il est donc possible

que cette interaction détectée *in vitro* pour Rab5b avec la technique de recouvrement sur gel sur des protéines purifiées ne se reproduise pas *in vivo*.

Une autre possibilité à envisager est que Tau interagisse avec Rab5a, mais aussi les deux autres isoformes de Rab5 qui sont Rab5b et Rab5c. En effet, lors de la réalisation de l'expérience de recouvrement sur gel avec des microsomes totaux, l'interaction de Tau avec la Rab5a a été difficile à détecter. Par comparaison avec l'interaction de Tau avec la tubuline (Figure 8, p58/A) ou avec les neurofilaments (Figure 8, p58), l'interaction de Tau avec Rab5a semblait faible. Il se peut donc que nous n'ayons pas détecté l'interaction de Tau avec Rab5b et Rab5c avec la technique utilisée ici. Il serait donc intéressant d'étudier si Tau pourrait interagir avec Rab5c.

Cette technique de recouvrement sur gel nous a aussi permis de montrer que Tau n'interagissait pas *in vitro* avec deux autres GTPases, la Rab4 et la Rab6 (Figure 10, p66). L'interaction entre la protéine Tau et Rab5 était spécifique et n'était pas un mécanisme d'interaction généralisé à toutes les Rabs GTPases. Dans le futur, il serait intéressant de tester d'autres Rabs, notamment celles partageant une grande homologie de séquence et de structure avec la Rab5, telles que la Rab17, la Rab21, la Rab22A/22B et la Rab24 (Wennerberg et al., 2005). Il serait aussi intéressant de tester la Rab7, qui est impliquée dans l'endocytose et qui régule la conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs (Rink et al., 2005; Vonderheit and Helenius, 2005).

4.2.2.Co-localisation de Tau et Rab5 *in vivo*

4.2.2.1.Immuno-isolation de membranes contenant Tau et Rab5

L'utilisation d'une technique d'immuno-isolation nous a permis de montrer une co-localisation entre la protéine Tau et Rab5. En effet, des billes magnétiques couplées à un anticorps contre Tau ont permis d'immuno-isoler *in vivo* des membranes contenant de la Tau et de Rab5 dans un homogénat de cerveau de rat adulte (Figure 11/A, p71). De plus, nous avons immuno-isolé des vésicules contenant de la Tau et de la Rab5 à partir d'une population de vésicules enrichie en endosomes Rab5-positifs, provenant de synaptosomes (Figure 11/C, p71). Ces résultats ne nous indiquaient pas une interaction entre les deux protéines, mais une proximité entre elles. Cette technique d'immuno-isolation, combinée à d'autres techniques *in vitro* et *in vivo*, a été utilisée pour identifier des complexes protéiques interagissant avec une protéine d'intérêt (Wilson et al., 2006). Pour déterminer si deux protéines interagissent *in vitro*, il serait envisageable d'utiliser dans le futur une technique de co-immuno-précipitation. Le protocole est assez similaire, si ce n'est l'addition de détergents afin de séparer les complexes protéiques et de dissocier les membranes. Cette technique a permis d'immuno-précipiter des protéines et leurs interacteurs directs et a été utilisée dans plusieurs études d'interaction (Miernyk and Thelen, 2008).

4.2.2.2.Localisation de Tau et Rab5 dans les neurones de l'hippocampe

Les résultats de microscopie confocale sur les cultures de neurones d'hippocampe d'embryons de rat ne nous ont pas permis de montrer une co-localisation convaincante

entre la protéine Tau et les structures Rab5-positives. En effet, les neurones transfectés avec la Tau-GFP et la Rab5-mRFP présentaient des axones avec un marquage uniforme pour la Tau-GFP, ainsi qu'un marquage ponctiforme pour la Rab5mRFP (Figure 12, p73). Le marquage pour la protéine Tau étant uniforme, l'utilisation d'une autre protéine axonale aurait sans doute donné le même résultat. Pour voir la co-localisation, il serait nécessaire d'enlever le pool de Tau non lié à des membranes en perméabilisant les neurones et en les fixant ensuite, à la différence de ce qui a été fait ici. Une quantification de la co-localisation serait alors nécessaire.

Les techniques de microscopie classique ont leurs limites, car même en utilisant des images de microscopie électronique qui permettraient de distinguer des éléments beaucoup plus petits, on ne pourrait démontrer d'interaction entre deux protéines. D'autres techniques assez récentes existent en microscopie optique confocale, qui permettent de montrer l'interaction de deux protéines, comme par exemple le FRET ou le BRET (Ciruela, 2008). Brièvement, le principe de ces techniques est de coupler chacune des protéines d'intérêt à un fluorophore qui est excité seulement en présence du second. Une fois ces constructions transfectées et exprimées dans les cellules, on obtient une fluorescence seulement si les protéines se retrouvent suffisamment proches, traduisant une interaction directe.

4.2.3. Interaction *in vitro* de Rab5 avec la région de Tau qui se lie aux MTs

L'interaction entre Rab5a et Tau-CT a été confirmée en utilisant la technique de recouvrement sur gel sur des protéines recombinantes humaines purifiées (Figure 9/A, p62). Des expériences similaires avec des mutants de délétion de Tau nous ont permis de cerner un peu plus précisément cette région d'interaction. Nous avons identifié une région

de la protéine Tau contenant la première répétition R1 comme étant suffisante pour produire cette interaction (Figure 9/B, p62). Mais rien ne nous permettait d'affirmer qu'elle était la seule région d'interaction avec Rab5. Pour vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de réaliser d'autres mutants de délétion de Tau, à commencer par un mutant où seule la répétition R1 serait enlevée. L'ajout de la répétition R2 semblait renforcer l'interaction de la Tau avec Rab5. Il serait aussi intéressant de réaliser un mutant où seule la répétition R2 serait enlevée, et un second mutant sans les répétitions R1 et R2. Ces mutants de délétion de Tau nous permettraient de statuer sur l'importance de ces deux répétitions R1 et R2 au niveau de l'interaction avec Rab5. De plus, l'effet de gradation de l'interaction observée lorsque l'on ajoute la seconde répétition R2 à notre construction de Tau suggérait que l'interaction pourrait être liée au nombre de répétitions. Si cette hypothèse s'avérait juste, et que toutes les répétitions R1 à R4 de la Tau permettent une interaction avec la Rab5, alors il serait intéressant de muter ponctuellement en alanine les motifs d'acides aminés communs à toutes les répétitions, afin de supprimer l'interaction. Par contre, si plusieurs répétitions, mais pas toutes, permettaient l'interaction entre la Tau et la Rab5, il serait intéressant de muter ponctuellement les acides aminés spécifiques à ces répétitions. La combinaison de ces deux types de mutants, couplée à la technique de recouvrement sur gel, devrait permettre d'identifier avec précision la zone ou les acides aminés responsables de l'interaction entre la protéine Tau et la Rab5. Une fois la répétition identifiée, nous pourrions alors produire ce fragment protéique et voir s'il permet à lui seul l'interaction avec la Rab5.

4.3.Ancrage des endosomes précoces sur les MTs par l'action de la protéine Tau

Nous avons montré que la Tau et la Rab5 interagissaient *in vitro* et co-localisaient *in vivo*, soulignant leur interaction potentielle. De plus, une immuno-isolation sur les vésicules provenant de synaptosomes nous a permis d'immuno-isoler des vésicules contenant de la protéine Tau, ainsi que de la Rab5 et de la clathrine (Figure 11/C, p71). Or, la Rab5 et la clathrine sont des protéines que l'on retrouve sur les endosomes précoces (Nixon, 2005). Donc, d'après nos résultats, la protéine Tau se trouverait vraisemblablement sur les endosomes précoces.

4.3.1.Régulation de l'interaction des endosomes précoces sur les MTs axonaux par la protéine Tau

Un des rôles principaux de Tau est de se lier aux éléments du cytosquelette, tels que les MTs (Buee et al., 2000). La protéine Tau pourrait donc faire le lien entre les endosomes précoces et les MTs dans l'axone.

4.3.1.1.Exemples de protéines régulant l'interaction entre des organelles et les éléments du cytosquelette

Un rôle similaire pour Tau avec d'autres organelles a déjà été décrit dans la littérature, la protéine Tau s'associant aux mitochondries ou à l'appareil de golgi, et fait le lien entre ces organelles et les MTs (Farah et al., 2006; Rendon et al., 1990). Une étude a montré un lien entre le réticulum endoplasmique rugueux et les MTs, par l'intermédiaire des protéines

MAP2 et p63 (Farah et al., 2005). Deux familles de protéines, les CLIPs et leurs protéines associées, les CLASPs, sont connues pour faire le lien entre les organelles et les MTs (Galjart, 2005). Une étude récente a montré le rôle important de la Syntaphilin, qui immobilise les mitochondries dans l'axone sur les MTs (Kang et al., 2008). La protéine adaptatrice HAP-40, un effecteur de Rab5, recrute la protéine huntingtin, créant ainsi un lien entre les MTs et les endosomes précoces (Pal et al., 2006). Dans cette étude, la sur-expression de HAP-40 a causé une réduction drastique de la motilité des endosomes précoces sur les MTs, en créant une association préférentielle avec les filaments d'actine. Tau pourrait donc faire partie de cette famille émergente de protéines qui lie les éléments membranaires aux MTs.

Des études ont déjà montré l'interaction directe de Rab5 avec les MTs dans des cellules non neuronales (Nielsen et al., 1999; Scheel and Kreis, 1991). D'après *Nielsen et al.*, l'interaction entre les MTs et Rab5 pourrait-être régulée par une MAP. Ils ont en effet démontré que cette interaction était indépendante de l'action des moteurs kinésine et dynéine, par un essai *in vitro*, en ajoutant de l'ATP qui inhibe l'action de ces moteurs (Vale et al., 1985). La MAP la plus présente au niveau du réseau de MT axonaux étant la Tau (Binder et al., 1985), si une MAP régule effectivement l'interaction de Rab5 avec les MTs, il pourrait s'agir de Tau dans les axones des neurones.

4.3.1.2. Distributions similaires des protéines Tau et Rab5 dans l'axone des neurones primaires de l'hippocampe

Si la Tau permettait l'ancrage des endosomes précoces aux MTs axonaux, alors nous devrions pouvoir observer une distribution similaire des deux protéines, ce qui traduirait un contact entre elles. Dans les axones de neurones co-transfectés avec un vecteur

contrôle GFP et de la Rab5-mRFP, nous avons remarqué que la protéine Rab5 fluorescente avait un gradient proximo-distal (Figure 14/D, p80). Le fort pourcentage de surface fluorescente au niveau proximale semble être dû à la surexpression de la protéine fluorescente en provenance du corps cellulaire du neurone. Or, les axones de neurones en culture montraient une augmentation progressive de la concentration de Tau endogène vers leur extrémité distale (Black et al., 1996). Donc, la distribution de la Rab5 fluorescente suit celle de la Tau endogène dans les neurones co-transfectés avec un vecteur contrôle GFP et la Rab5-mRFP. De plus, lorsque la protéine Tau a été sur-exprimée dans des neurones en culture, celle-ci a adoptée un gradient inversé, c'est-à-dire décroissant vers la terminaison axonale (Figure 12/A, p73) (Desjardins, 2005). Cette diminution de la concentration de Tau dans l'axone plus on s'éloigne du corps cellulaire peut s'expliquer par le fait que Tau est synthétisée dans le corps cellulaire du neurone, puis transportée dans l'axone par une kinésine (Utton et al., 2005). Dans les axones co-transfectés avec la Tau-GFP et la Rab5-mRFP, nous avons observé que la Rab5-mRFP présentait aussi ce gradient inversé (Figure 14/D, p80). La Tau et la Rab5 avaient donc le même profil de distribution dans les axones. Ces résultats ont renforcé l'hypothèse que Tau ancrerait les vésicules Rab5-positives sur les MTs axonaux.

4.3.1.3. Quantification des endosomes précoces dans les axones sur-exprimant la Tau

Si la Tau permettait l'ancrage des endosomes précoces sur les MTs axonaux, alors vraisemblablement nous devrions observer plus d'endosomes précoces dans des axones où la Tau était sur-exprimée. Dans ces cultures de neurones, les axones transfectés avec la Tau

présentaient un plus grand nombre de vésicules Rab5-positives que ceux transfectés avec le fragment Tau-NT (Figure 14/A, p80). Ce résultat aurait pu être interprétée comme une augmentation de l'ancrage des endosomes précoces dans les axones où la Tau était surexprimée. Toutefois, cette augmentation du nombre de structures Rab5-positives était corrélée à une augmentation du niveau de transfection avec Rab5. En effet, pour une même durée d'exposition, les corps cellulaires des neurones transfectés avec la Tau étaient plus souvent saturés en Rab5-mRFP que les corps cellulaires des neurones transfectés avec le contrôle. De plus, les mesures de surface de fluorescence de la Rab5-mRFP qui sont une mesure semi-quantitative de la quantité de protéine fluorescente exprimée, ont donné des résultats toujours beaucoup plus élevés pour les neurones transfectés avec la Tau (Figure 14/C, p80). L'augmentation du nombre de structures Rab5-positives pouvait donc s'expliquer simplement par l'augmentation de la quantité de protéine Rab5, plutôt que par un effet de Tau sur les structures Rab5-positives. De plus, les cellules transfectées avec Tau-NT n'avaient pas la morphologie typique des neurones en culture, l'axone et les dendrites étaient plus courts. Or, une étude a montré qu'un petit fragment de Tau était toxique dans les neurones de l'hippocampe en culture (Park and Ferreira, 2005). Afin de vérifier la qualité de notre contrôle Tau-NT-GFP, il serait nécessaire de réaliser des études de toxicité de Tau-NT sur les neurones de l'hippocampe en culture.

Afin de déterminer si le niveau d'expression de Tau pourrait avoir un effet sur le nombre d'endosomes précoces dans l'axone, nous pourrions utiliser des neurones primaires de l'hippocampe de souris Tau-KO. De telles souris sont disponibles, où l'ADNc de la GFP a été insérée dans l'exon 1 du gène de Tau (Tucker et al., 2001). Les neurones en cultures présentaient des axones avec un retard de croissance et étaient légèrement plus courts que leurs homologues de souris contrôles, mais le réseau de MTs était intact. A priori, si la Tau permettait l'ancrage des endosomes précoces sur les MTs, il devrait y avoir moins

d'endosomes précoces dans les axones des neurones en culture provenant des souris Tau-KO.

4.3.2.Ancrage des endosomes précoces sur les MTs axonaux par l'action de Tau sur les moteurs kinésine et dynéine

4.3.2.1.Régulation des moteurs kinésine et dynéine par la Tau

Une étude récente a montré que les endosomes précoces étaient transportés par les moteurs kinésine et dynéine le long des MTs (Loubéry et al., 2008). Or, les endosomes précoces ont été montrés immobiles dans les axones des neurones (Deinhardt et al., 2006), qui est le compartiment neuronal où la Tau est localisée (Buee et al., 2000). Le rôle de Tau dans l'ancrage des endosomes précoces sur les MTs pourrait être aussi indirect, en agissant sur les moteurs kinésine et dynéine. La présence de la Tau sur les endosomes Rab5-positifs servirait à reconnaître les MTs axonaux. Une fois sur les MTs, la Tau pourrait interagir avec les moteurs dynéine et kinésine, empêchant ainsi le transport des endosomes précoces. En effet, de nombreuses études ont montré que la Tau régulait l'action des moteurs dynéine et kinésine (Dixit et al., 2008; Dubey et al., 2008; Seitz et al., 2002; Stamer et al., 2002; Vershinin et al., 2007). Les endosomes précoces pourraient alors se lier directement aux MTs comme cela a été démontré dans plusieurs études (Nielsen et al., 1999; Scheel and Kreis, 1991) et resteraient immobiles du fait de l'absence de transport axonal.

4.3.2.2.Effet de la sur-expression de Tau sur le transport axonal dans les neurones primaires de l'hippocampe

Dans les études montrant que la Tau régulait l'action de la kinésine et de la dynéine (Dixit et al., 2008; Dubey et al., 2008; Seitz et al., 2002; Stamer et al., 2002; Vershinin et al., 2007), la sur-expression de Tau dans l'axone de neurones a provoqué une rupture du transport axonal. Les organelles habituellement transportés se retrouvaient piégés près du corps cellulaire ou à la terminaison axonale. Or, dans nos expériences où la protéine Tau a été sur-exprimée dans les axones, des vésicules Rab5-positives ont été observées tout le long de l'axone (Figure 13, p78 ; Figures 14/A et 14/B, p80). Ces résultats ont montré que la sur-expression de la Tau n'a pas inhibé le transport axonal dans notre modèle expérimental. L'ancrage des endosomes précoces sur les MTs axonaux se produirait donc par l'intermédiaire de l'interaction avec Tau, plutôt que par le biais d'une inhibition des moteurs.

Pour vérifier si la Tau pourrait réguler les moteurs et ancrer les endosomes précoces sur les MTs axonaux, il serait intéressant d'analyser leur motilité en utilisant un modèle où la Tau est supprimée. Nous pourrions utiliser une technique de vidéo-microscopie dans des cultures primaires de neurones de l'hippocampe de souris Tau-KO par rapport à des souris contrôles. Si des endosomes précoces sont observés dans l'axone, nous pourrions étudier leur motilité. Si les endosomes précoces sont plus mobiles dans les axones Tau-KO, alors la Tau devrait ancrer les endosomes Rab5-positifs de façon indirecte en inhibant leur motilité. Mais, la motilité des endosomes précoces pourrait être affectée indirectement par le retard de croissance des axones de neurones sans Tau (Tucker et al., 2001), ou par éléments compensatoires mis en place, tels que la MAP1. Dans ce cas, il serait possible d'effectuer le même genre d'expérience de vidéo-microscopie sur des axones de neurones où l'on

inhibera la Tau avec un système d'ARN inhibiteur, une fois la croissance de l'axone terminée.

4.4.Rôle de Tau dans le cycle GTP/GDP de Rab5

D'après nos résultats, Tau et Rab5 interagissent *in vitro* et co-localisent sur une même population de vésicules *in vivo*, vraisemblablement les endosomes précoces. De plus, la Tau semblerait jouer un rôle dans l'ancrage des endosomes précoces sur les MTs axonaux. Or, lorsque la Rab5 est attachée à la membrane des endosomes précoces, elle est soumise à un cycle d'activation/inactivation en étant soit liée au GDP ou au GTP. Les différents types d'interacteurs intervenant dans le cycle de Rab5 ont une affinité privilégiée pour la Rab5 liée soit au GDP ou au GTP (Figure 5, p31). Est-ce que Tau pourrait avoir un rôle supplémentaire en lien avec Rab5, en plus de celui d'ancrer les endosomes précoces sur les MTs ?

4.4.1.Interaction préférentielle de Tau avec la Rab5-GTP

Afin de déterminer le rôle de Tau dans le cycle de la petite GTPase Rab5, nous avons testé l'affinité de Tau pour les deux formes de Rab5, soit liée au GDP ou au GTP. Ce type d'expérience a été réalisé dans de nombreuses études pour déterminer le rôle d'interacteurs de Rab5 dans son cycle GTP/GDP (Chamberlain et al., 2004; Horiuchi et al., 1997; Pal et al., 2006; Simonsen et al., 1998; Stenmark et al., 1995). D'après les résultats d'une première expérience, Tau a interagi avec les deux formes de Rab5, mais avec une plus grande affinité pour la Rab5-GTP (Figure 16, p86). Ceci nous suggérait que la protéine Tau était soit un effecteur, soit une GAP pour la Rab5. En effet, ces deux types d'interacteurs sont ceux qui interagissent avec la forme active des Rabs, liée au GTP (Figure 5, p31). Une étude a décrit deux mutants de Rab5 qui se liaient soit au GDP (Rab5-S34N), soit au GTP (Rab5-Q79L) (Stenmark et al., 1994). L'utilisation de ces mutants dans le même genre

d'expérience *in vitro* qu'avec la Rab5 seule pourrait permettre de confirmer l'interaction préférentielle de la Tau avec l'une ou l'autre forme de Rab5. La Tau devrait interagir avec la Rab5-S34N et avec une plus grande affinité avec la Rab5-Q79L. L'interaction de Tau avec les deux formes de Rab5 semblait refléter ici ses deux fonctions. Tout d'abord un ancrage passif des endosomes précoces sur les MTs, quelque soit le nucléotide auquel Rab5 est liée. Ensuite, une seconde fonction liée au GTP, en tant qu'effecteur ou de GAP de Rab5.

4.4.2. Tau, une GAP pour Rab5 ?

4.4.2.1. Mesure de l'effet GAP

Afin de déterminer si Tau avait un effet GAP sur la Rab5, nous avons collaboré avec le *Pr. D. Anderson*, qui a mis au point une technique pour mesurer l'activité GAP d'une protéine envers Rab5 (Anderson and Chamberlain, 2005). Nos expériences ont montré que Tau avait un effet GAP envers Rab5 (Figure 17/A et 17/B, p89). Cet effet GAP se situait dans la même région de Tau que l'interaction de Tau et de Rab5, à savoir la région contenue dans Tau-CT (Figure 17/C, p89). Cependant, la région étant assez large, il serait possible que la zone responsable de l'interaction soit différente de la zone responsable de l'effet GAP. Une fois que nous aurons identifié la région protéique ou les acides aminés de Tau responsables de l'interaction avec Rab5, nous pourrons tenter de mieux cerner la région de Tau responsable de l'effet GAP. Il suffirait de tester l'effet GAP des mutants ponctuels et de délétion de la protéine Tau avec la technique de détection d'effet GAP déjà utilisée. De plus, afin de montrer la spécificité de l'effet GAP de Tau

envers Rab, il serait intéressant de tester si Tau a un effet GAP envers d'autres GTPases de la famille des Rabs.

4.4.2.2.Comparaison de Tau avec d'autres GAPs pour Rab5

D'après nos résultats, il semblerait que Tau possède un effet GAP envers Rab5 (Figure 17, p89). Or d'autres GAPs ont déjà connues comme possédant un effet GAP envers Rab5, telles que RN-Tre, p120-GAP, tuberine, p85 α et RabGAP-5 ((Chamberlain et al., 2004; Haas et al., 2005; Lanzetti et al., 2000) ;(Liu and Li, 1998; Xiao et al., 1997). Il est pourtant difficile de comparer les différentes GAPs de Rab5 entre elles, car les auteurs des études réalisées sur ces GAPs utilisent souvent des protocoles différents, et ne comparent pas la GAP qu'ils viennent de découvrir aux autres GAPs déjà connues. Malgré tout, on peut quand même comparer ces études pour avoir un ordre d'idée général. RN-Tre, p120-GAP, tuberine et RabGAP-5 semblent avoir un effet GAP fort envers Rab5, avec une hydrolyse du GTP en GDP détectable assez rapidement pour une petite quantité de protéine GAP. Le taux d'hydrolyse du GTP est augmenté de l'ordre de 2 à 4 fois. En comparaison, la p85 α permet d'augmenter le taux d'hydrolyse du GTP d'environ 10 fois, mais pour des quantités de protéine GAP beaucoup plus importantes. En effet, la concentration de p85 α doit être de l'ordre du micromolaire pour pouvoir détecter un effet, alors que pour les autres GAPs de Rab5, les auteurs utilisent des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Donc à priori, cela ferait de la p85 α une GAP faible pour Rab5.

p85 α cf Fig 17, p89). Cela en fait une GAP pour Rab5 d'une force similaire à la , soit une GAP faible. Pourtant, est-ce que cela en fait une nouvelle fonction pour Tau qui est dénuée d'intérêt ? La a beau être jugée comme une GAP faible, elle semble pourtant jouer un rôle suffisamment important dans l'endocytose et le trafic intracellulaire, pour que son

inactivation par la caspase-8 provoque une activation notable de Rab5 (Torres et al., 2008). Afin de comparer efficacement la Tau aux autres GAP de Rab5, il serait intéressant de reproduire l'essai GAP que nous avons utilisé dans cette étude, mais avec d'autres GAPs déjà connues pour Rab5, afin d'avoir des protocoles expérimentaux identiques.

4.4.2.3. Influence de l'effet GAP de Tau sur la motilité des endosomes précoces

Plusieurs études ont montré que le rôle majeur de l'activation de Rab5 est de recruter EEA1, afin de favoriser la fusion des endosomes précoces (Callaghan et al., 1999; Christoforidis et al., 1999; Mills et al., 1998; Simonsen et al., 1998). Or, une étude a montré que EEA1 était absent des axones des neurones de l'hippocampe (Wilson et al., 2000). Donc à priori, du fait que Tau et EEA1 se situent dans des compartiments différents, il était peu probable que l'effet GAP de Tau sur Rab5 puisse avoir un rôle à jouer au niveau de la fusion des endosomes Rab5-positifs. Par contre, l'effet GAP de Tau sur Rab5 pourrait réguler la motilité des endosomes précoces sur les MTs axonaux. En effet, une étude a montré que la Rab5 devait être liée au GTP pour être mobile sur les MTs (Nielsen et al., 1999). Si la protéine Tau était une GAP pour Rab5 et la faisait passer du stade GTP au stade GDP, les endosomes Rab5-positifs devraient être immobiles dans l'axone. Or, cette observation a été reportée dans une étude récente (Deinhardt et al., 2006). Tau permettrait donc l'ancrage des endosomes précoces sur les MTs, en créant un lien entre les endosomes précoces et les MTs, mais aussi en favorisant l'hydrolyse du GTP en GDP par son action GAP.

Afin de vérifier si l'effet GAP de Tau envers Rab5 a un impact sur la motilité des endosomes précoces, il serait intéressant d'étudier la motilité des endosomes précoces dans

l'axone de neurones en culture par vidéo-microscopie, en sur-exprimant les mutants Rab5-S34N et Rab5-Q79L, dans des neurones Tau-KO ou de souris normales. Une étude a montré que le mutant Rab5-S34N était toujours lié au GDP, alors que la Rab5-Q79L était toujours lié au GTP (Stenmark et al., 1994). Si l'effet GAP de Tau envers Rab5 joue sur la motilité des endosomes précoces, alors leur motilité devrait être augmentée dans les axones co-transfectés avec la Tau et la Rab5-Q79L, par rapport à des axones co-transfectés avec la Tau et la Rab5. De même, si la motilité des endosomes est augmentée dans des axones Tau-KO transfectés avec Rab5, alors la sur-expression de Rab5-S34N dans ces axones Tau-KO devrait inhiber la motilité des endosomes Rab5-positifs.

4.4.2.4. Si Tau est une GAP, peut-on la détecter sur les endosomes précoces ?

Si Tau est une GAP tel que nos résultats préliminaires semblent l'indiquer, elle ne devrait pas être stable sur les endosomes précoces et permettre leur ancrage sur les MTs. En effet, suite à l'inactivation de Rab5 par une GAP, la RabGDI extrait la Rab5-GDP de la membrane des endosomes précoces (Ullrich et al., 1994). Donc si Tau est une GAP pour Rab5, on ne devrait pas pouvoir la détecter sur les endosomes précoces. Or, nos résultats d'immuno-isolations montrent que nous sommes capables de détecter de la Tau sur des vésicules Rab5-positives (Figure 11, p71), sans stabiliser l'interaction entre Tau et Rab5 ; par exemple en inhibant l'activité GAP de Tau par l'usage de GTP γ S. Le fait que la Tau semble être une GAP faible nous a sans doute permis de détecter cette interaction, ce que nous n'aurions pas pu faire avec une GAP forte. Si Tau est une GAP faible, alors il est possible que le temps d'inactivation de toutes les molécules de Rab5-GTP soit suffisamment long pour permettre une semi-stabilité de Tau sur les endosomes précoces, et

donc sa détection. La Tau, par son interaction à la fois avec la tubuline et la Rab5, permettrait l'ancrage des endosomes précoces sur les MTs. L'effet GAP de Tau envers Rab5 rendrait cet ancrage et cette immobilisation momentanée. En effet, au fur et à mesure que l'activité GAP de Tau permettrait l'inactivation de Rab5 et son retrait de la membrane endosomale par la RabGDI, les endosomes précoces retrouveraient leur capacité de mouvement. Durant ce processus, les endosomes pourraient changer d'identité et devenir des endosomes tardifs Rab7-positifs, par un mécanisme de conversion (Rink et al., 2005),

Une façon nette d'adresser si Tau permet l'ancrage des endosomes précoces sur les MTs, que ce soit par son aspect GAP et/ou son interaction avec Rab5, serait d'examiner la liaison des endosomes précoces sur des MTs *in vitro* en présence ou en l'absence de Tau. Mais nous ne serions pas capables pour autant de distinguer si Tau ancre les endosomes en faisant le lien avec les MTs, ou grâce à son effet GAP. Il serait alors nécessaire de faire la même expérience en utilisant un mutant pour Tau étant capable de se lier à Rab5, mais dont l'effet GAP serait inhibé. Ainsi, nous pourrions dissocier l'impact de l'effet GAP de Tau pour Rab5 sur la motilité des endosomes précoces de l'ancrage direct par l'interaction de Tau avec Rab5.

4.4.2.5. Tau, une séquence de ciblage des endosomes précoces vers les microtubules ?

En plus d'être présente sur les MTs axonaux, la protéine Tau a été montrée comme étant localisée à la membrane plasmique (Brandt et al., 1995). La question se pose si la protéine Tau pourrait interagir avec la Rab5, dès le début de l'endocytose et servir de séquence de ciblage des endosomes précoces vers les MTs. La littérature nous fournit ici un point de comparaison très intéressant avec la petite GTPase Arf6 et la centaurine, une GAP

pour Arf6. En effet, la superfamille des Ras-GTPases est composée de cinq branches : Ras, Rho, Rab, Ran et Arf (Wennerberg et al., 2005). Comme les Rabs, les petite GTPases de la branche des Arfs sont impliquées dans le transport vésiculaire. Dans cette famille, la petite GTPase Arf6 joue un rôle essentiel dans le système nerveux central en régulant l'endocytose ainsi que l'organisation du cytosquelette d'actine (Jaworski, 2007). Arf6 est notamment impliquée dans le recyclage du récepteur endosomal carboxypeptidase E (CPE) (Arnaoutova et al., 2003). La CPE est nécessaire au transport vésiculaire de façon antérograde et rétrograde du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) dans l'axone des neurones de l'hippocampe (Lou et al., 2005 ; Park et al., 2008). Le BDNF joue plusieurs rôles au sein du système nerveux central, notamment dans la différenciation cellulaire, la survie neuronale, la croissance dendritique, ainsi que la synaptogenèse (Greenberg et al., 2009). À l'image des Rabs, le cycle GDP/GTP des Arfs est régulée par des GEFs et des GAPs (Nie et al., 2003). Parmi les GAPs connues pour Arf6, on trouve la famille des centaurines, qui sont capable de réguler le cytosquelette d'actine (Thacker et al., 2004 ; Venkateswarlu et al., 2004). De plus, ces travaux ont montré que la centaurine alpha-1 pouvait interagir directement avec l'actine, de manière indépendante de l'effet GAP. Une étude a montré que la centaurine avait une distribution cellulaire localisée dans les neurones, au niveau de structure vésiculaires dans les terminaisons pré-synaptiques (Kreutz et al., 1997). Toutes ces données nous permettent d'esquisser un tableau cohérent pour le rôle que joue la centaurine dans l'internalisation de la CPE. La Arf6 sous forme active, liée à du GTP, permet l'endocytose du récepteur CPE. Une fois que les vésicules endocytaires Arf6-positives sont formées, la centaurine interagit avec Arf6, permettant l'hydrolyse du GTP en GDP, et inactivant Arf6. Lors de ce processus, la centaurine peut se lier aux microfilaments d'actine, afin que les vésicules contenant le récepteur CPE puissent être transportées le long de l'axone.

La protéine Tau pourrait avoir le même rôle sur les endosomes Rab5-positifs que la centaurine sur les vésicules Arf6-positives, mais en dirigeant ces vésicules vers les MTs au lieu des microfilaments d'actine. Lors de l'endocytose par la Rab5 activée au niveau de la membrane plasmique, la Tau pourrait se lier aux endosomes précoces grâce à son interaction préférentielle avec la Rab5-GTP. Puis, du fait de son interaction avec la tubuline, elle pourrait amener et ancrer les endosomes précoces sur les MTs. Lors de ce processus, la Tau inactiverait les vésicules Rab5-positives en favorisant l'hydrolyse du GTP en GDP, ce qui ajouterait à l'effet d'ancrage. La Rab5-GDP serait ensuite extraite des membranes endosomales, brisant ainsi l'ancrage des endosomes sur les MTs. Au fur et à mesure que la Rab5-GDP serait extraite, les endosomes précoces pourraient être convertis en endosomes tardifs. Ces endosomes retrouveraient alors leur liberté de mouvement et pourraient être transportés par les protéines motrices le long de l'axone.

4.5.Implication de l'interaction et de l'effet GAP de Tau envers Rab5 dans les neuropathologies

Nous avons démontré que Tau interagissait et avait un effet GAP envers la petite GTPase Rab5, qui est impliquée dans l'endocytose précoce (Bucci et al., 1992; Gorvel et al., 1991). Or, dans les tauopathies, la Tau devient hyperphosphorylée ce qui affecte ses interactions protéine-protéine (Buee et al., 2000). Quelles seraient les conséquences au niveau du neurone si jamais cette interaction et/ou l'effet GAP envers Rab5 étaient affectés ? Existerait-il des preuves montrant que l'endocytose pourrait être affectée dans les neuropathologies ?

4.5.1.Déficits de l'endocytose dans les neuropathologies

Plusieurs études ont montré que des neuropathologies présentaient des déficits de la voie endocytaire, impliquant pour certaines la petite GTPase Rab5. Une étude sur des patients atteints de démence fronto-temporale (FTD) de type 3 a permis de mettre en évidence l'implication d'une sous-unité du complexe endosomal ESCRTIII lié à l'endocytose dans cette neuropathologie (Skibinski et al., 2005). Des études ont montré que la forme précoce de sclérose amyotrophique latérale était due à des mutations causant une perte de fonction sur le gène ALS-2 (Devon et al., 2006; Hadano et al., 2006). La protéine codée par ALS-2, nommée alsin, est composée de plusieurs domaines GEF, dont un domaine Vps9 permettant l'activation de Rab5 (Hadano et al., 2007; Hadano et al., 2004; Otomo et al., 2003). Une étude très récente sur des cerveaux humains atteints de forme sporadique de la maladie de Creutzfeld-Jacob a montré un volume d'endosomes Rab5-positifs et des enzymes lysosomales anormalement élevées dans les neurones (Kovacs et

al., 2007). Une étude récente a permis de faire un lien entre la maladie de Huntington et la protéine huntingtin (Htt), avec la petite GTPase Rab5, par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice HAP-40 (Pal et al., 2006). HAP-40 régulait le recrutement de Htt par l'intermédiaire de Rab5 sur les endosomes précoces et la surexpression de HAP-40 causait une réduction drastique de la motilité des endosomes précoces sur les MTs, en créant une association préférentielle avec les filaments d'actine. Les exemples de neuropathologies où la voie endocytaire est détériorée sont nombreux, ce qui souligne l'impact que pourrait avoir une perturbation de l'interaction et/ou de l'effet GAP de Tau envers Rab5 sur la neurodégénérescence.

4.5.2.Déficits de l'endocytose dans la maladie d'Alzheimer

Des anomalies de l'endocytose ont aussi été observées dans la maladie d'Alzheimer. Cette Tauopathie est caractérisée par la présence d'agrégats neurofibrillaires de Tau hyperphosphorylée, ainsi que de plaques β -amyloïdes. Les agrégats de Tau hyperphosphorylée sont caractéristiques d'un stade très avancé de la maladie. Ils sont précédés par des niveaux élevés d'oligomères de peptide A β solubles, qui sont vraisemblablement cytotoxiques. Une étude a montré qu'aux tous premiers stades de la pathologie, quand les niveaux d'A β commençaient à augmenter, beaucoup de neurones présentaient des endosomes Rab5 positifs anormalement élargis (Cataldo et al., 2004). La plupart de ces gros endosomes possédaient une immuno-réactivité contre A β (Cataldo et al., 2004). Plusieurs effecteurs de Rab5 tels que EEA1 ainsi que Rabaptin-5 se retrouvaient aussi dans ces gros endosomes et l'expression de Rab4 était augmentée (Cataldo et al., 1997; Cataldo et al., 2000). On a observé aussi une augmentation du niveau de Rab7, ainsi que des gros endosomes Rab7-positifs dans les neurones du cortex de tissus de patients

atteints (Cataldo et al., 2008). La génération d'A β augmente de façon substantielle quand la taille des endosomes est augmentée dans des cellules en sur-exprimant Rab5 (Grbovic et al., 2003). De plus, ces anomalies endosomales ne semblent pas être une réponse à la sur-production d'A β , ni une conséquence générale de neurones stressés ou en dégénérescence dans d'autres maladies neurodégénératives (Cataldo et al., 2000). Pour le moment aucun lien entre les anomalies de l'endocytose observées et Tau n'avait pu être fait.

4.5.3. Est-ce que l'interaction de Tau avec Rab5 pourrait être altérée en condition pathologique ?

Nos résultats ont montré une interaction *in vitro* entre Tau et Rab5, ainsi qu'une co-localisation *in vivo* de Tau et Rab5 sur une même population de vésicules, vraisemblablement les endosomes précoces. Le rôle de Tau sur les endosomes précoces serait double : (1)-L'interaction entre Tau et Rab5 permettrait l'ancrage des endosomes précoces sur les MTs axonaux. (2)-L'effet GAP de Tau envers Rab5 régulerait la motilité de ces endosomes précoces sur les MTs axonaux. Or, dans les Tauopathies, des études ont montré que la Tau devenait hyperphosphorylée, était relocalisée dans le corps cellulaire des neurones et formait des agrégats (Braak et al., 1994; Kowall and Kosik, 1987). Quel pourrait être l'impact de ces modifications de Tau sur son rôle présumé dans l'endocytose ?

Les agrégats de Tau hyperphosphorylée dans le corps cellulaire du neurone pourraient conduire à une séquestration de la Rab5 et des endosomes précoces. De fait, une étude sur des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a montré une co-localisation partielle entre de la Tau hyperphosphorylée et la Rab5 dans des neurones présentant un profil typique pré-agrégats (An et al., 2003). En séquestrant la Rab5 et les endosomes précoces, les agrégats de Tau pourraient causer une neurodégénérescence.

De plus, la Tau et la Rab5 sont deux protéines qui sont régulées par phosphorylation (Avila et al.; Chiariello et al., 1999). Cet aspect pourrait agir sur leur interaction, venant inhiber ou augmenter celle-ci. Des études ont montré que plusieurs GAPs étaient régulées par phosphorylation (Lanzetti et al., 2007; Minoshima et al., 2003). Un débalancement dans l'équilibre des kinases et des phosphatases, comme dans le cas des Tauopathies, pourrait donc affecter la phosphorylation des protéines et donc non seulement l'interaction entre Tau et Rab5, mais aussi l'effet GAP de Tau envers Rab5. La motilité des endosomes précoces sur les MTs axonaux pourrait être affectée, ce qui pourrait conduire à la neurodégénérescence.

La protéine Tau, par son rôle supposé de GAP envers Rab5, pourrait aussi jouer un rôle dans la conversion des endosomes précoces Rab5-positifs en endosomes tardifs Rab7-positifs. En effet, des modèles mathématiques proposent un lien direct entre le nucléotide auquel est lié Rab5 et la conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs (Del Conte-Zerial et al., 2008). Des mutants ponctuels de Rab5 viennent conforter ce modèle : le mutant Rab5-Q79L incapable d'hydrolyser le GTP, favorise la conversion en endosomes tardifs (Rink et al., 2005), alors que le mutant Rab5-S34, toujours chargé en GDP, semble inhiber cette conversion (Papini et al., 1997). Dans les Tauopathies, l'hyperphosphorylation de Tau et sa relocalisation dans le corps cellulaire des neurones pourrait affecter son effet GAP envers Rab5. Cette altération de l'effet GAP pourrait se traduire moins de conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs. Or, la conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs a été montré comme jouant un rôle essentiel sur le transport rétrograde des neurotrophines jusqu'au corps cellulaire (Deinhardt et al., 2006; Delcroix et al., 2003). La voie de signalisation des neurotrophines est essentielle à la croissance et à la survie du neurone et une rupture de cette voie de signalisation pourrait entraîner la

neurodégénérescence. Donc la relocalisation de la Tau dans les Tauopathies pourrait ainsi induire la neurodégénérescence.

4.5.4.Cas de la démence fronto-temporale FTDP-17

Nous avons testé si les mutants de Tau, P301L, V337M et R406W, pouvaient avoir un impact sur l'interaction et/ou l'effet GAP de Tau envers Rab5. Une étude a montré que ces mutations de Tau causaient la pathologie de démence fronto-temporale FTDP-17 (Hutton et al., 1998). De plus, ces mutations étaient toutes les trois situées dans le mutant de délétion Tau-CT qui interagissait et avait un effet GAP envers Rab5 (Figure 9/A & 17/C, p62). Le lien entre la neurodégénérescence et les mutations n'est pas encore parfaitement compris, même si le rôle de Tau est indubitable. L'utilisation de la technique de recouvrement sur gel sur ces trois mutants de Tau n'a pas révélé de différence d'interaction avec la Rab5a, par rapport à la Tau normale (Figure 9/A, p62). De même, les résultats indiquaient que les mutants de Tau, P301L, V337M et R406W n'avaient pas d'effet significatif sur l'activité GAP de Tau envers Rab5a (Figure 17/D, p89). Mais les protéines testées ici ont été produites et purifiées des bactéries, et étaient donc non-phosphorylées. Or, dans le cadre de la démence fronto-temporale FTDP-17, les mutants de Tau sont naturellement phosphorylés, voire même hyper-phosphorylés, ce qui pourrait influencer leur interaction avec Rab5 comme sur l'effet GAP de Tau envers Rab5. En effet, des études ont montré que certaines GAPs avaient leur action régulée par phosphorylation (Lanzetti et al., 2007; Minoshima et al., 2003). Des souris JNPL3, qui sur-exprimaient de la Tau mutante humaine P301L hyperphosphorylée, dans les motoneurones de la moelle-épineière, présentaient aussi une augmentation du niveau de Rab5 par rapport aux souris contrôles (Figure 15, p83). Ce résultat soulignait l'existence d'une relation potentielle entre Tau et Rab5.

4.5.5. Identification de la voie d'endocytose régulée par Tau

Dans les neurones, la Rab5 est impliquée dans des voies de dégradations, telles que l'endocytose des récepteurs AMPA (Brown et al., 2005), mais aussi dans des voies de signalisation, telles que l'endocytose et le transport rétrograde des neurotrophines (Deinhardt et al., 2006; Delcroix et al., 2003; Grimes et al., 1996; Ye et al., 2003). Afin d'identifier la voie d'endocytose précoce où serait impliquée l'interaction et/ou l'effet GAP de Tau envers Rab5, nous pourrions caractériser les endosomes Rab5-positifs contenant de la Tau en utilisant un système de cytométrie en flux. Une telle technique a déjà été employée pour caractériser des endosomes tardifs Rab7-positifs (Meresse et al., 1997). La comparaison par spectrométrie de masse des protéines contenues dans des endosomes contenant la Rab5 et la Tau, par rapport à des endosomes contenant uniquement la Rab5, devrait nous donner une très bonne indication sur le rôle spécifique de Tau dans l'endocytose précoce. Ce résultat permettrait d'identifier plus précisément la voie d'endocytose qui serait potentiellement affectée dans le cadre des Tauopathies.

4.6. Conclusions

Des études ont démontré que l'hyperphosphorylation de Tau pouvait causer une perte d'interaction avec les MTs et induisait l'effondrement du réseau de MTs axonaux (Ebner et al., 1999). Pourtant, chez des souris où le gène de Tau a été inactivé, les MTs étaient toujours présents, même si on observait une diminution de leur stabilité (Harada et al., 1994). Cependant, ces souris ont développé une faiblesse musculaire et certaines altérations comportementales à un âge très avancé (Harada et al., 1994; Ikegami et al., 2000). Ces symptômes suggéraient donc une certaine atteinte neurologique due à l'absence de Tau, indépendante de la stabilité des MTs axonaux. Nous proposons donc que la perte d'interaction et/ou d'effet GAP de la protéine Tau envers Rab5 soient responsables des atteintes neurologiques observées.

5.BIBLIOGRAPHIE

- (1993). Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 75, 1305-1315.
- (European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium,1993). Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 75, 1305-1315.
- Aamodt, E.J., and Williams, R.C., Jr. (1984). Microtubule-associated proteins connect microtubules and neurofilaments in vitro. *Biochemistry* 23, 6023-6031.
- Abraha, A., Ghoshal, N., Gamblin, T.C., Cryns, V., Berry, R.W., Kuret, J., and Binder, L.I. (2000). C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci* 113 Pt 21, 3737-3745.
- Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K., and Wittinghofer, A. (1997). Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol* 4, 686-689.
- Al-Bassam, J., Ozer, R.S., Safer, D., Halpain, S., and Milligan, R.A. (2002). MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol* 157, 1187-1196.
- Albert, S., and Gallwitz, D. (1999). Two new members of a family of Ypt/Rab GTPase activating proteins. Promiscuity of substrate recognition. *J Biol Chem* 274, 33186-33189.
- Albert, S., Will, E., and Gallwitz, D. (1999). Identification of the catalytic domains and their functionally critical arginine residues of two yeast GTPase-activating proteins specific for Ypt/Rab transport GTPases. *EMBO J* 18, 5216-5225.
- Alexandrov, K., Simon, I., Yurchenko, V., Iakovenko, A., Rostkova, E., Scheidig, A.J., and Goody, R.S. (1999). Characterization of the ternary complex between Rab7, REP-1 and Rab geranylgeranyl transferase. *Eur J Biochem* 265, 160-170.
- Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001). Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6923-6928.
- An, W.L., Cowburn, R.F., Li, L., Braak, H., Alafuzoff, I., Iqbal, K., Iqbal, I.G., Winblad, B., and Pei, J.J. (2003). Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 163, 591-607.
- Anderson, D.H., and Chamberlain, M.D. (2005). Assay and stimulation of the Rab5 GTPase by the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Methods Enzymol* 403, 552-561.
- Andreadis, A., Brown, W.M., and Kosik, K.S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31, 10626-10633.
- Arnaoutova, I., Jackson, C.L., Al-Awar, O.S., Donaldson, J.G., and Loh, Y.P. (2003). Recycling of Raft-associated prohormone sorting receptor carboxypeptidase E requires interaction with ARF6. *Mol Biol Cell* 14, 4448-4457.
- Arnett, A.L., Bayazitov, I., Blaabjerg, M., Fang, L., Zimmer, J., and Baskys, A. (2004). Antisense oligonucleotide against GTPase Rab5b inhibits metabotropic agonist DHPG-induced neuroprotection. *Brain Res* 1028, 59-65.

Aronov, S., Aranda, G., Behar, L., and Ginzburg, I. (2001). Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci* 21, 6577-6587.

Aronov, S., Aranda, G., Behar, L., and Ginzburg, I. (2002). Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J Cell Sci* 115, 3817-3827.

Arrasate, M., Perez, M., and Avila, J. (2000). Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res* 25, 43-50.

Auld, D.S., and Robitaille, R. (2003). Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40, 389-400.

Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., and Hernandez, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84, 361-384.

Baas, P.W., Black, M.M., and Banker, G.A. (1989). Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 109, 3085-3094.

Baas, P.W., Deitch, J.S., Black, M.M., and Banker, G.A. (1988). Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8335-8339.

Bamburg, J.R., Minamide, L.S., Morgan, T.E., Hayden, S.M., Giuliano, K.A., and Koffer, A. (1991). Purification and characterization of low-molecular-weight actin-depolymerizing proteins from brain and cultured cells. *Methods Enzymol* 196, 125-140.

Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Wisniewski, H.M. (1989). Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* 477, 90-99.

Banker, G. (1998). Culturing nerve cells. Edited by A Bradford Book, the MIT Press, 666p.

Barbieri, M.A., Hoffenberg, S., Roberts, R., Mukhopadhyay, A., Pomrehn, A., Dickey, B.F., and Stahl, P.D. (1998). Evidence for a symmetrical requirement for Rab5-GTP in in vitro endosome-endosome fusion. *J Biol Chem* 273, 25850-25855.

Barbieri, M.A., Roberts, R.L., Gumusboga, A., Highfield, H., Alvarez-Dominguez, C., Wells, A., and Stahl, P.D. (2000). Epidermal growth factor and membrane trafficking. EGF receptor activation of endocytosis requires Rab5a. *J Cell Biol* 151, 539-550.

Barker, P.A., Hussain, N.K., and McPherson, P.S. (2002). Retrograde signaling by the neurotrophins follows a well-worn trk. *Trends Neurosci* 25, 379-381.

Bartlett, W.P., and Banker, G.A. (1984a). An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci* 4, 1944-1953.

Bartlett, W.P., and Banker, G.A. (1984b). An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J Neurosci* 4, 1954-1965.

Becker, J., Tan, T.J., Trepte, H.H., and Gallwitz, D. (1991). Mutational analysis of the putative effector domain of the GTP-binding Ypt1 protein in yeast suggests specific regulation by a novel GAP activity. *EMBO J* 10, 785-792.

Binder, L.I., Frankfurter, A., and Rebhun, L.I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101, 1371-1378.

Blaabjerg, M., Baskys, A., Zimmer, J., and Vawter, M.P. (2003). Changes in hippocampal gene expression after neuroprotective activation of group I metabotropic glutamate receptors. *Brain Res Mol Brain Res* *117*, 196-205.

Black, M.M., Slaughter, T., Moshiah, S., Obrocka, M., and Fischer, I. (1996). Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J Neurosci* *16*, 3601-3619.

Bonifacino, J.S. (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 23-32.

Bouvier, D., Corera, A.T., Tremblay, M.E., Riad, M., Chagnon, M., Murai, K.K., Pasquale, E.B., Fon, E.A., and Doucet, G. (2008). Pre-synaptic and post-synaptic localization of EphA4 and EphB2 in adult mouse forebrain. *J Neurochem* *106*, 682-695.

Braak, H., Braak, E., and Strothjohann, M. (1994). Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. *Neurosci Lett* *171*, 1-4.

Bradke, F., and Dotti, C.G. (1999). The role of local actin instability in axon formation. *Science* *283*, 1931-1934.

Brady, S.T., Lasek, R.J., and Allen, R.D. (1982). Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. *Science* *218*, 1129-1131.

Bramblett, G.T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1992). Regions with abundant neurofibrillary pathology in human brain exhibit a selective reduction in levels of binding-competent tau and accumulation of abnormal tau-isoforms (A68 proteins). *Lab Invest* *66*, 212-222.

Brandt, R., and Lee, G. (1993). The balance between tau protein's microtubule growth and nucleation activities: implications for the formation of axonal microtubules. *J Neurochem* *61*, 997-1005.

Brandt, R., Leger, J., and Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* *131*, 1327-1340.

Brion, J.P., Guilleminot, J., Couchie, D., Flament-Durand, J., and Nunez, J. (1988). Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum. *Neuroscience* *25*, 139-146.

Brodin, L., Low, P., and Shupliakov, O. (2000). Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* *10*, 312-320.

Brodsky, F.M., Chen, C.Y., Knuehl, C., Towler, M.C., and Wakeham, D.E. (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* *17*, 517-568.

Brown, D.A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* *14*, 111-136.

Brown, T.C., Tran, I.C., Backos, D.S., and Esteban, J.A. (2005). NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD. *Neuron* *45*, 81-94.

Bucci, C., Lutcke, A., Steele-Mortimer, O., Olkkonen, V.M., Dupree, P., Chiariello, M., Bruni, C.B., Simons, K., and Zerial, M. (1995). Co-operative regulation of endocytosis by three Rab5 isoforms. *FEBS Lett* *366*, 65-71.

Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* *70*, 715-728.

Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33, 95-130.

Burd, C.G., Mustol, P.A., Schu, P.V., and Emr, S.D. (1996). A yeast protein related to a mammalian Ras-binding protein, Vps9p, is required for localization of vacuolar proteins. *Mol Cell Biol* 16, 2369-2377.

Caceres, A., Banker, G., Steward, O., Binder, L., and Payne, M. (1984). MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res* 315, 314-318.

Caceres, A., Banker, G.A., and Binder, L. (1986). Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 6, 714-722.

Caceres, A., and Kosik, K.S. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343, 461-463.

Caceres, A., Potrebic, S., and Kosik, K.S. (1991). The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci* 11, 1515-1523.

Callaghan, J., Nixon, S., Bucci, C., Toh, B.H., and Stenmark, H. (1999). Direct interaction of EEA1 with Rab5b. *Eur J Biochem* 265, 361-366.

Cameron, P.L., Sudhof, T.C., Jahn, R., and De Camilli, P. (1991). Colocalization of synaptophysin with transferrin receptors: implications for synaptic vesicle biogenesis. *J Cell Biol* 115, 151-164.

Carrier, M.F., Simon, C., Cassoly, R., and Pradel, L.A. (1984). Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie* 66, 305-311.

Carney, D.S., Davies, B.A., and Horazdovsky, B.F. (2006). Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. *Trends Cell Biol* 16, 27-35.

Casey, P.J., and Seabra, M.C. (1996). Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* 271, 5289-5292.

Castellano, F., Chavrier, P., and Caron, E. (2001). Actin dynamics during phagocytosis. *Semin Immunol* 13, 347-355.

Cataldo, A.M., Barnett, J.L., Pieroni, C., and Nixon, R.A. (1997). Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J Neurosci* 17, 6142-6151.

Cataldo, A.M., Mathews, P.M., Boiteau, A.B., Hassinger, L.C., Peterhoff, C.M., Jiang, Y., Mullaney, K., Neve, R.L., Gruenberg, J., and Nixon, R.A. (2008). Down syndrome fibroblast model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects. *Am J Pathol* 173, 370-384.

Cataldo, A.M., Petanceska, S., Terio, N.B., Peterhoff, C.M., Durham, R., Mercken, M., Mehta, P.D., Buxbaum, J., Haroutunian, V., and Nixon, R.A. (2004). Abeta localization in abnormal endosomes: association with earliest Abeta elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol Aging* 25, 1263-1272.

Cataldo, A.M., Peterhoff, C.M., Troncoso, J.C., Gomez-Isla, T., Hyman, B.T., and Nixon, R.A. (2000). Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol* 157, 277-286.

Chamberlain, M.D., Berry, T.R., Pastor, M.C., and Anderson, D.H. (2004). The p85 α subunit of phosphatidylinositol 3'-kinase binds to and stimulates the GTPase activity of Rab proteins. *J Biol Chem* 279, 48607-48614.

Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N.J., and Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360, 674-677.

Chiariello, M., Bruni, C.B., and Bucci, C. (1999). The small GTPases Rab5a, Rab5b and Rab5c are differentially phosphorylated in vitro. *FEBS Lett* 453, 20-24.

Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D., and Zerial, M. (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397, 621-625.

Ciruela, F. (2008). Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Curr Opin Biotechnol* 19, 338-343.

Clabecq, A., Henry, J.P., and Darchen, F. (2000). Biochemical characterization of Rab3-GTPase-activating protein reveals a mechanism similar to that of Ras-GAP. *J Biol Chem* 275, 31786-31791.

Clark, L.N., Poorkaj, P., Wszolek, Z., Geschwind, D.H., Nasreddine, Z.S., Miller, B., Li, D., Payami, H., Awert, F., Markopoulou, K., *et al.* (1998). Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13103-13107.

Cleveland, D.W., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1977). Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116, 207-225.

Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004, RE13.

Correas, I., Padilla, R., and Avila, J. (1990). The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem J* 269, 61-64.

Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I.S., Liem, R.K., Shelanski, M.L., and Nunez, J. (1992). Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4378-4381.

Cowles, C.R., Snyder, W.B., Burd, C.G., and Emr, S.D. (1997). Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *EMBO J* 16, 2769-2782.

Cui, B., Wu, C., Chen, L., Ramirez, A., Bearer, E.L., Li, W.P., Mobley, W.C., and Chu, S. (2007). One at a time, live tracking of NGF axonal transport using quantum dots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13666-13671.

Davies, P. (2000). A very incomplete comprehensive theory of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 924, 8-16.

De Camilli, P., Moretti, M., Donini, S.D., Walter, U., and Lohmann, S.M. (1986). Heterogeneous distribution of the cAMP receptor protein RII in the nervous system: evidence for its intracellular accumulation on microtubules, microtubule-organizing centers, and in the area of the Golgi complex. *J Cell Biol* 103, 189-203.

de Hoop, M.J., Huber, L.A., Stenmark, H., Williamson, E., Zerial, M., Parton, R.G., and Dotti, C.G. (1994). The involvement of the small GTP-binding protein Rab5a in neuronal endocytosis. *Neuron* 13, 11-22.

de Renzis, S., Sonnichsen, B., and Zerial, M. (2002). Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. *Nat Cell Biol* 4, 124-133.

de Waegh, S.M., Lee, V.M., and Brady, S.T. (1992). Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68, 451-463.

Deinhardt, K., Salinas, S., Verastegui, C., Watson, R., Worth, D., Hanrahan, S., Bucci, C., and Schiavo, G. (2006). Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron* 52, 293-305.

Del Conte-Zerial, P., Bruschi, L., Rink, J.C., Collinet, C., Kalaidzidis, Y., Zerial, M., and Deutsch, A. (2008). Membrane identity and GTPase cascades regulated by toggle and cut-out switches. *Mol Syst Biol* 4, 206.

Delcroix, J.D., Valletta, J.S., Wu, C., Hunt, S.J., Kowal, A.S., and Mobley, W.C. (2003). NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* 39, 69-84.

Desjardins, M. (2005). Rôle de la phosphorylation dans la distribution cellulaire de la protéine tau. Mémoire de maîtrise, Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada.

Devon, R.S., Orban, P.C., Gerrow, K., Barbieri, M.A., Schwab, C., Cao, L.P., Helm, J.R., Bissada, N., Cruz-Aguado, R., Davidson, T.L., *et al.* (2006). Als2-deficient mice exhibit disturbances in endosome trafficking associated with motor behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9595-9600.

DiTella, M.C., Feiguin, F., Carri, N., Kosik, K.S., and Caceres, A. (1996). MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J Cell Sci* 109 (Pt 2), 467-477.

Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319, 1086-1089.

Dotti, C.G., and Banker, G.A. (1987). Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature* 330, 254-256.

Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8, 1454-1468.

Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., and Kirschner, M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3, 1141-1154.

Drubin, D.G., and Kirschner, M.W. (1986). Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103, 2739-2746.

Dubey, M., Chaudhury, P., Kabiru, H., and Shea, T.B. (2008). Tau inhibits anterograde axonal transport and perturbs stability in growing axonal neurites in part by displacing kinesin cargo: neurofilaments attenuate tau-mediated neurite instability. *Cell Motil Cytoskeleton* 65, 89-99.

Dubreuil, R.R. (2006). Functional links between membrane transport and the spectrin cytoskeleton. *J Membr Biol* 211, 151-161.

Ebneth, A., Drewes, G., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1999). Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 44, 209-224.

Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143, 777-794.

Farah, C.A., Liazoghli, D., Perreault, S., Desjardins, M., Guimont, A., Anton, A., Lauzon, M., Kreibich, G., Paiement, J., and Leclerc, N. (2005). Interaction of

microtubule-associated protein-2 and p63: a new link between microtubules and rough endoplasmic reticulum membranes in neurons. *J Biol Chem* 280, 9439-9449.

Farah, C.A., Perreault, S., Liazoghli, D., Desjardins, M., Anton, A., Lauzon, M., Paiement, J., and Leclerc, N. (2006). Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* 63, 710-724.

Feinstein, S.C., and Wilson, L. (2005). Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochim Biophys Acta* 1739, 268-279.

Fuchs, E., Haas, A.K., Spooner, R.A., Yoshimura, S., Lord, J.M., and Barr, F.A. (2007). Specific Rab GTPase-activating proteins define the Shiga toxin and epidermal growth factor uptake pathways. *J Cell Biol* 177, 1133-1143.

Galjart, N. (2005). CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 487-498.

Gibbs, J.B., Schaber, M.D., Allard, W.J., Sigal, I.S., and Scolnick, E.M. (1988). Purification of ras GTPase activating protein from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5026-5030.

Giuditta, A., Chun, J.T., Eyman, M., Cefaliello, C., Bruno, A.P., and Crispino, M. (2008). Local gene expression in axons and nerve endings: the glia-neuron unit. *Physiol Rev* 88, 515-555.

Goedert, M., and Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* 9, 4225-4230.

Goedert, M., Spillantini, M.G., and Crowther, R.A. (1992). Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1983-1987.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989a). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519-526.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., and Crowther, R.A. (1989b). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 8, 393-399.

Goedert, M., Wischik, C.M., Crowther, R.A., Walker, J.E., and Klug, A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4051-4055.

Goode, B.L., Denis, P.E., Panda, D., Radeke, M.J., Miller, H.P., Wilson, L., and Feinstein, S.C. (1997). Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell* 8, 353-365.

Goode, B.L., and Feinstein, S.C. (1994). Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* 124, 769-782.

Goody, R.S., Rak, A., and Alexandrov, K. (2005). The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments. *Cell Mol Life Sci* 62, 1657-1670.

Gorvel, J.P., Chavrier, P., Zerial, M., and Gruenberg, J. (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64, 915-925.

Goslin, K., Asmussen, H., and Banker, G. (1998). Rat hippocampal neurons in low-density culture. In: *Culturing nerve cells*, 2nd édition, ed G. Banker and K. Goslin. MI Press, Cambridge, Massachusetts, 339-370.

Goslin, K., and Banker, G. (1989). Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 108, 1507-1516.

Gotz, J., and Ittner, L.M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9, 532-544.

Grant, P., and Pant, H.C. (2000). Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J Neurocytol* 29, 843-872.

Grbovic, O.M., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Dinakar, R., Summers-Terio, N.B., Ceresa, B.P., Nixon, R.A., and Cataldo, A.M. (2003). Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production. *J Biol Chem* 278, 31261-31268.

Greenberg, M.E., Xu, B., Lu, B., and Hempstead, B.L. (2009). New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci* 29, 12764-12767.

Grimes, M.L., Zhou, J., Beattie, E.C., Yuen, E.C., Hall, D.E., Valletta, J.S., Topp, K.S., LaVail, J.H., Bunnett, N.W., and Mobley, W.C. (1996). Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci* 16, 7950-7964.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., and Wisniewski, H.M. (1986a). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261, 6084-6089.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986b). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4913-4917.

Guzik, B.W., and Goldstein, L.S. (2004). Microtubule-dependent transport in neurons: steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction. *Curr Opin Cell Biol* 16, 443-450.

Haas, A.K., Fuchs, E., Kopajtich, R., and Barr, F.A. (2005). A GTPase-activating protein controls Rab5 function in endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 7, 887-893.

Haase, C., Stieler, J.T., Arendt, T., and Holzer, M. (2004). Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation. *J Neurochem* 88, 1509-1520.

Hadano, S., Benn, S.C., Kakuta, S., Otomo, A., Sudo, K., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Mizumura, H., Shefner, J.M., Cox, G.A., *et al.* (2006). Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *Hum Mol Genet* 15, 233-250.

Hadano, S., Kunita, R., Otomo, A., Suzuki-Utsunomiya, K., and Ikeda, J.E. (2007). Molecular and cellular function of ALS2/alsin: implication of membrane dynamics in neuronal development and degeneration. *Neurochem Int* 51, 74-84.

Hadano, S., Otomo, A., Suzuki-Utsunomiya, K., Kunita, R., Yanagisawa, Y., Showguchi-Miyata, J., Mizumura, H., and Ikeda, J.E. (2004). ALS2CL, the novel protein highly homologous to the carboxy-terminal half of ALS2, binds to Rab5 and modulates endosome dynamics. *FEBS Lett* 575, 64-70.

Hall, R.A. (2004). Studying protein-protein interactions via blot overlay or Far Western blot. *Methods Mol Biol* 261, 167-174.

Hama, H., Tall, G.G., and Horazdovsky, B.F. (1999). Vps9p is a guanine nucleotide exchange factor involved in vesicle-mediated vacuolar protein transport. *J Biol Chem* 274, 15284-15291.

Hanger, D.P., Anderton, B.H., and Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15, 112-119.

Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., and Hirokawa, N. (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369, 488-491.

Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.

Heerssen, H.M., and Segal, R.A. (2002). Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci* 25, 160-165.

Heimann, R., Shelanski, M.L., and Liem, R.K. (1985). Microtubule-associated proteins bind specifically to the 70-kDa neurofilament protein. *J Biol Chem* 260, 12160-12166.

Henriquez, J.P., Cross, D., Vial, C., and Maccioni, R.B. (1995). Subpopulations of tau interact with microtubules and actin filaments in various cell types. *Cell Biochem Funct* 13, 239-250.

Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M.W., and Martin, D.W., Jr. (1989). Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9, 1381-1388.

Hirokawa, N. (1991). Molecular architecture and dynamics of the neuronal cytoskeleton. In: *The neuronal cytoskeleton*, ed R.D. Burgoyne. Wiley-Liss, New York, 5-74.

Hirokawa, N. (1994). Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 74-81.

Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519-526.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 682-696.

Hirokawa, N., Shiomura, Y., and Okabe, S. (1988). Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* 107, 1449-1459.

Holzbaumer, E.L. (2004). Motor neurons rely on motor proteins. *Trends Cell Biol* 14, 233-240.

Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B.I., Geschwind, D.H., Bird, T.D., McKeel, D., Goate, A., *et al.* (1998). Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282, 1914-1917.

Horio, T., and Hotani, H. (1986). Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* 321, 605-607.

Horiuchi, H., Giner, A., Hoflack, B., and Zerial, M. (1995). A GDP/GTP exchange-stimulatory activity for the Rab5-RabGDI complex on clathrin-coated vesicles from bovine brain. *J Biol Chem* 270, 11257-11262.

Horiuchi, H., Lippe, R., McBride, H.M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M., and Zerial, M. (1997). A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* 90, 1149-1159.

Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., *et al.* (1998). Association of

missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705.

Hwang, S.C., Jhon, D.Y., Bae, Y.S., Kim, J.H., and Rhee, S.G. (1996). Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem* 271, 18342-18349.

Ikegami, S., Harada, A., and Hirokawa, N. (2000). Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neurosci Lett* 279, 129-132.

Jaworski, J. (2007). ARF6 in the nervous system. *Eur J Cell Biol* 86, 513-524.

Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2008). Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J Biol Chem* 283, 32066-32076.

Jenkins, S.M., and Johnson, G.V. (1998). Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport* 9, 67-71.

Johnson, G.V. (1992). Differential phosphorylation of tau by cyclic AMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: metabolic and functional consequences. *J Neurochem* 59, 2056-2062.

Kaech, S., Brinkhaus, H., and Matus, A. (1999). Volatile anesthetics block actin-based motility in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10433-10437.

Kanai, Y., Chen, J., and Hirokawa, N. (1992). Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *EMBO J* 11, 3953-3961.

Kanai, Y., Takemura, R., Oshima, T., Mori, H., Ihara, Y., Yanagisawa, M., Masaki, T., and Hirokawa, N. (1989). Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J Cell Biol* 109, 1173-1184.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., and Jessell, T.M. (2000). Principles of neural science. New York: McGraw-Hill Health Professions Division.

Kanemaru, K., Takio, K., Miura, R., Titani, K., and Ihara, Y. (1992). Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments. *J Neurochem* 58, 1667-1675.

Kang, J.S., Tian, J.H., Pan, P.Y., Zald, P., Li, C., Deng, C., and Sheng, Z.H. (2008). Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation. *Cell* 132, 137-148.

Kapeller, R., Chakrabarti, R., Cantley, L., Fay, F., and Corvera, S. (1993). Internalization of activated platelet-derived growth factor receptor-phosphatidylinositol-3' kinase complexes: potential interactions with the microtubule cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 13, 6052-6063.

Kar, S., Fan, J., Smith, M.J., Goedert, M., and Amos, L.A. (2003). Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J* 22, 70-77.

Katzmann, D.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145-155.

Kempf, M., Clement, A., Faissner, A., Lee, G., and Brandt, R. (1996). Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J Neurosci* 16, 5583-5592.

Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192-193.

Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S., and Riezman, H. (1997). Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9, 488-495.

Knops, J., Kosik, K.S., Lee, G., Pardee, J.D., Cohen-Gould, L., and McConlogue, L. (1991). Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol* 114, 725-733.

Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bakalis, S., and Neve, R.L. (1989). Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2, 1389-1397.

Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Binder, L., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., and Lee, G. (1988). Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron* 1, 817-825.

Kovacs, G.G., Gelpi, E., Strobel, T., Ricken, G., Nyengaard, J.R., Bernheimer, H., and Budka, H. (2007). Involvement of the endosomal-lysosomal system correlates with regional pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 66, 628-636.

Kowall, N.W., and Kosik, K.S. (1987). Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 22, 639-643.

Kreutz, M.R., Bockers, T.M., Sabel, B.A., Hulser, E., Stricker, R., and Reiser, G. (1997). Expression and subcellular localization of p42IP4/centaurin-alpha, a brain-specific, high-affinity receptor for inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in rat brain. *Eur J Neurosci* 9, 2110-2124.

Kurzchalia, T.V., and Parton, R.G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 11, 424-431.

Lanzetti, L., Margaria, V., Melander, F., Virgili, L., Lee, M.H., Bartek, J., and Jensen, S. (2007). Regulation of the Rab5 GTPase-activating protein RN-tre by the dual specificity phosphatase Cdc14A in human cells. *J Biol Chem* 282, 15258-15270.

Lanzetti, L., Rybin, V., Malabarba, M.G., Christoforidis, S., Scita, G., Zerial, M., and Di Fiore, P.P. (2000). The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature* 408, 374-377.

LaPointe, N.E., Morfini, G., Pigino, G., Gaisina, I.N., Kozikowski, A.P., Binder, L.I., and Brady, S.T. (2009). The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: implications for filament toxicity. *J Neurosci Res* 87, 440-451.

Leclerc, N., Baas, P.W., Garner, C.C., and Kosik, K.S. (1996). Juvenile and mature MAP2 isoforms induce distinct patterns of process outgrowth. *Mol Biol Cell* 7, 443-455.

Lee, G., Neve, R.L., and Kosik, K.S. (1989). The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2, 1615-1624.

Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H., and Panchamoorthy, G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111 (Pt 21), 3167-3177.

Lee, M.K., and Cleveland, D.W. (1996). Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19, 187-217.

Lee, V.M., Balin, B.J., Otvos, L., Jr., and Trojanowski, J.Q. (1991). A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 251, 675-678.

Lee, V.M., Goedert, M., and Trojanowski, J.Q. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24, 1121-1159.

Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (1992). The disordered neuronal cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 2, 653-656.

Leterrier, J.F., Liem, R.K., and Shelanski, M.L. (1982). Interactions between neurofilaments and microtubule-associated proteins: a possible mechanism for intraorganellar bridging. *J Cell Biol* 95, 982-986.

Li, G., D'Souza-Schorey, C., Barbieri, M.A., Roberts, R.L., Klippel, A., Williams, L.T., and Stahl, P.D. (1995). Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10207-10211.

Liazoghli, D., Perreault, S., Micheva, K.D., Desjardins, M., and Leclerc, N. (2005). Fragmentation of the Golgi apparatus induced by the overexpression of wild-type and mutant human tau forms in neurons. *Am J Pathol* 166, 1499-1514.

Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 259, 5301-5305.

Lippe, R., Miaczynska, M., Rybin, V., Runge, A., and Zerial, M. (2001). Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol Biol Cell* 12, 2219-2228.

Litersky, J.M., and Johnson, G.V. (1992). Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem* 267, 1563-1568.

Litersky, J.M., and Johnson, G.V. (1995). Phosphorylation of tau in situ: inhibition of calcium-dependent proteolysis. *J Neurochem* 65, 903-911.

Litman, P., Barg, J., and Ginzburg, I. (1994). Microtubules are involved in the localization of tau mRNA in primary neuronal cell cultures. *Neuron* 13, 1463-1474.

Litman, P., Barg, J., Rindzoonski, L., and Ginzburg, I. (1993). Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron* 10, 627-638.

Liu, J., Lamb, D., Chou, M.M., Liu, Y.J., and Li, G. (2007). Nerve growth factor-mediated neurite outgrowth via regulation of Rab5. *Mol Biol Cell* 18, 1375-1384.

Liu, K., and Li, G. (1998). Catalytic domain of the p120 Ras GAP binds to RAB5 and stimulates its GTPase activity. *J Biol Chem* 273, 10087-10090.

Lou, H., Kim, S.K., Zaitsev, E., Snell, C.R., Lu, B., and Loh, Y.P. (2005). Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e. *Neuron* 45, 245-255.

Loubery, S., Wilhelm, C., Hurbain, I., Neveu, S., Louvard, D., and Coudrier, E. (2008). Different microtubule motors move early and late endocytic compartments. *Traffic* 9, 492-509.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Lu, M., and Kosik, K.S. (2001). Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Mol Biol Cell* 12, 171-184.

Ludin, B., and Matus, A. (1993). The neuronal cytoskeleton and its role in axonal and dendritic plasticity. *Hippocampus* 3 *Spec No*, 61-71.

Luo, L. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 601-635.

Luzio, J.P., Rous, B.A., Bright, N.A., Pryor, P.R., Mullock, B.M., and Piper, R.C. (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* 113 (Pt 9), 1515-1524.

Maas, T., Eidenmuller, J., and Brandt, R. (2000). Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem* 275, 15733-15740.

Magnani, E., Fan, J., Gasparini, L., Golding, M., Williams, M., Schiavo, G., Goedert, M., Amos, L.A., and Spillantini, M.G. (2007). Interaction of tau protein with the dynactin complex. *EMBO J* 26, 4546-4554.

Malinow, R., and Malenka, R.C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25, 103-126.

Mandelkow, E.M., Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., and Mandelkow, E. (2003). Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging* 24, 1079-1085.

Mandell, J.W., and Banker, G.A. (1996). Microtubule-associated proteins, phosphorylation gradients, and the establishment of neuronal polarity. *Perspect Dev Neurobiol* 4, 125-135.

Markgraf, D.F., Peplowska, K., and Ungermann, C. (2007). Rab cascades and tethering factors in the endomembrane system. *FEBS Lett* 581, 2125-2130.

Marks, B., Stowell, M.H., Vallis, Y., Mills, I.G., Gibson, A., Hopkins, C.R., and McMahon, H.T. (2001). GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* 410, 231-235.

Mattson, M.P. (1999). Establishment and plasticity of neuronal polarity. *J Neurosci Res* 57, 577-589.

Matus, A. (1994). Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends Neurosci* 17, 19-22.

Mawal-Dewan, M., Henley, J., Van de Voorde, A., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1994). The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. *J Biol Chem* 269, 30981-30987.

McBride, H.M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R., and Zerial, M. (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* 98, 377-386.

McLauchlan, H., Newell, J., Morrice, N., Osborne, A., West, M., and Smythe, E. (1998). A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Curr Biol* 8, 34-45.

McNiven, M.A. (1998). Dynamin: a molecular motor with pinchase action. *Cell* 94, 151-154.

Meresse, S., Andre, P., Mishal, Z., Barad, M., Brun, N., Desjardins, M., and Gorvel, J.P. (1997). Flow cytometric sorting and biochemical characterization of the late endosomal rab7-containing compartment. *Electrophoresis* 18, 2682-2688.

Mi, K., and Johnson, G.V. (2006). The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 3, 449-463.

Miernyk, J.A., and Thelen, J.J. (2008). Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant J* 53, 597-609.

Mills, I.G., Jones, A.T., and Clague, M.J. (1998). Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Curr Biol* 8, 881-884.

Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonzuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y.C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S., Jr., *et al.* (2003). Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell* 4, 549-560.

Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.

Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761-772.

Morfini, G., Pigino, G., Mizuno, N., Kikkawa, M., and Brady, S.T. (2007). Tau binding to microtubules does not directly affect microtubule-based vesicle motility. *J Neurosci Res* 85, 2620-2630.

Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K., and Ihara, Y. (1995). Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol Aging* 16, 365-371; discussion 371-380.

Mu, F.T., Callaghan, J.M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R.G., Campbell, P.L., McCluskey, J., Yeo, J.P., Tock, E.P., and Toh, B.H. (1995). EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem* 270, 13503-13511.

Nelson, P.T., Stefansson, K., Gulcher, J., and Saper, C.B. (1996). Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 67, 1622-1632.

Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., and Donlon, T.A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 387, 271-280.

Nie, Z., Hirsch, D.S., and Randazzo, P.A. (2003). Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol* 15, 396-404.

Nielsen, E., Christoforidis, S., Uttenweiler-Joseph, S., Miaczynska, M., Dewitte, F., Wilm, M., Hoflack, B., and Zerial, M. (2000). Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J Cell Biol* 151, 601-612.

Nielsen, E., Severin, F., Backer, J.M., Hyman, A.A., and Zerial, M. (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol* 1, 376-382.

Nixon, R.A. (2005). Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 26, 373-382.

Noh, D.Y., Shin, S.H., and Rhee, S.G. (1995). Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim Biophys Acta* 1242, 99-113.

Otomo, A., Hadano, S., Okada, T., Mizumura, H., Kunita, R., Nishijima, H., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Kohiki, E., Suga, E., *et al.* (2003). ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet* 12, 1671-1687.

Otsu, N. (1979). A threshold selection method from grey scale histogram. *IEEE Trans. on Syst. Man and Cyber. I*, 62-66.

Pal, A., Severin, F., Lommer, B., Shevchenko, A., and Zerial, M. (2006). Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease. *J Cell Biol* 172, 605-618.

Pan, X., Eathiraj, S., Munson, M., and Lambright, D.G. (2006). TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* 442, 303-306.

Papini, E., Satin, B., Bucci, C., de Bernard, M., Telford, J.L., Manetti, R., Rappuoli, R., Zerial, M., and Montecucco, C. (1997). The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *EMBO J* 16, 15-24.

Paquet, D., Bhat, R., Sydow, A., Mandelkow, E.M., Berg, S., Hellberg, S., Falting, J., Distel, M., Koster, R.W., Schmid, B., and Haass, C. (2009). A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J Clin Invest* 119, 1382-1395.

Park, J.J., Cawley, N.X., and Loh, Y.P. (2008). A bi-directional carboxypeptidase E-driven transport mechanism controls BDNF vesicle homeostasis in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 39, 63-73.

Park, M., Penick, E.C., Edwards, J.G., Kauer, J.A., and Ehlers, M.D. (2004). Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 305, 1972-1975.

Park, S.Y., and Ferreira, A. (2005). The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J Neurosci* 25, 5365-5375.

Paschal, B.M., Shpetner, H.S., and Vallee, R.B. (1987). MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J Cell Biol* 105, 1273-1282.

Patki, V., Virbasius, J., Lane, W.S., Toh, B.H., Shpetner, H.S., and Corvera, S. (1997). Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7326-7330.

Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M., and Helenius, A. (2004). Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118, 767-780.

Perreault, S., Bousquet, O., Lauzon, M., Paiement, J., and Leclerc, N. (2009). Increased association between rough endoplasmic reticulum membranes and mitochondria in transgenic mice that express P301L tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 503-514.

Pfeffer, S.R., Dirac-Svejstrup, A.B., and Soldati, T. (1995). Rab GDP dissociation inhibitor: putting rab GTPases in the right place. *J Biol Chem* 270, 17057-17059.

Piper, R.C., and Luzio, J.P. (2001). Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* 2, 612-621.

Planel, E., Krishnamurthy, P., Miyasaka, T., Liu, L., Herman, M., Kumar, A., Bretteville, A., Figueroa, H.Y., Yu, W.H., Whittington, R.A., *et al.* (2008). Anesthesia-induced hyperphosphorylation detaches 3-repeat tau from microtubules without affecting their stability in vivo. *J Neurosci* 28, 12798-12807.

Pollak, D., Cairns, N., and Lubec, G. (2003). Cytoskeleton derangement in brain of patients with Down syndrome, Alzheimer's disease and Pick's disease. *J Neural Transm Suppl*, 149-158.

Poorkaj, P., Bird, T.D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R.M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W.C., Raskind, M., and Schellenberg, G.D. (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 43, 815-825.

Rak, A., Fedorov, R., Alexandrov, K., Albert, S., Goody, R.S., Gallwitz, D., and Scheidig, A.J. (2000). Crystal structure of the GAP domain of Gyp1p: first insights into interaction with Ypt/Rab proteins. *EMBO J* 19, 5105-5113.

Rendon, A., Jung, D., and Jancsik, V. (1990). Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria. *Biochem J* 269, 555-556.

Reynolds, C.H., Garwood, C.J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., Zvelebil, M., Yang, A., Sheppard, P.W., Varndell, I.M., *et al.* (2008). Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem* 283, 18177-18186.

Ringstad, N., Nemoto, Y., and De Camilli, P. (1997). The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8569-8574.

Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-749.

Roberson, E.D., Scarce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.Q., and Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* **316**, 750-754.

Roux, S., Colasante, C., Saint Clément, C., Barbier, J., Curie, T., Girard, E., Molgo, J., and Brulet, P. (2005). Internalization of a GFP-tetanus toxin C-terminal fragment fusion protein at mature mouse neuromuscular junctions. *Mol Cell Neurosci* **30**, 79-89.

Rubino, M., Miaczynska, M., Lippe, R., and Zerial, M. (2000). Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem* **275**, 3745-3748.

Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S., and Takai, Y. (1990). Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem* **265**, 2333-2337.

Sato, S., Tatebayashi, Y., Akagi, T., Chui, D.H., Murayama, M., Miyasaka, T., Planel, E., Tanemura, K., Sun, X., Hashikawa, T., *et al.* (2002). Aberrant tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β and JNK3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells. *J Biol Chem* **277**, 42060-42065.

Sawa, A., Oyama, F., Matsushita, M., and Ihara, Y. (1994). Molecular diversity at the carboxyl terminus of human and rat tau. *Brain Res Mol Brain Res* **27**, 111-117.

Scheel, J., and Kreis, T.E. (1991). Motor protein independent binding of endocytic carrier vesicles to microtubules in vitro. *J Biol Chem* **266**, 18141-18148.

Schroer, T.A. (2004). Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 759-779.

Seabra, M.C., Mules, E.H., and Hume, A.N. (2002). Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol Med* **8**, 23-30.

Segev, N. (2001). Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 500-511.

Seitz, A., Kojima, H., Oiwa, K., Mandelkow, E.M., Song, Y.H., and Mandelkow, E. (2002). Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *EMBO J* **21**, 4896-4905.

Serrano, L., Montejo de Garcini, E., Hernandez, M.A., and Avila, J. (1985). Localization of the tubulin binding site for tau protein. *Eur J Biochem* **153**, 595-600.

Seto, E.S., Bellen, H.J., and Lloyd, T.E. (2002). When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev* **16**, 1314-1336.

Sever, S., Muhlberg, A.B., and Schmid, S.L. (1999). Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* **398**, 481-486.

Sgarra, R., Tessari, M.A., Di Bernardo, J., Rustighi, A., Zago, P., Liberatori, S., Armini, A., Bini, L., Giancotti, V., and Manfioletti, G. (2005). Discovering high mobility group A molecular partners in tumour cells. *Proteomics* **5**, 1494-1506.

Shapiro, A.D., and Pfeffer, S.R. (1995). Quantitative analysis of the interactions between prenyl Rab9, GDP dissociation inhibitor- α , and guanine nucleotides. *J Biol Chem* **270**, 11085-11090.

Shimizu, H., Kawamura, S., and Ozaki, K. (2003). An essential role of Rab5 in uniformity of synaptic vesicle size. *J Cell Sci* **116**, 3583-3590.

- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M., and Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 494-498.
- Skibinski, G., Parkinson, N.J., Brown, J.M., Chakrabarti, L., Lloyd, S.L., Hummerich, H., Nielsen, J.E., Hodges, J.R., Spillantini, M.G., Thusgaard, T., *et al.* (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* **37**, 806-808.
- Somsele Rodman, J., and Wandinger-Ness, A. (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* **113 Pt 2**, 183-192.
- Sorkin, A., Eriksson, A., Heldin, C.H., Westermark, B., and Claesson-Welsh, L. (1993). Pool of ligand-bound platelet-derived growth factor beta-receptors remain activated and tyrosine phosphorylated after internalization. *J Cell Physiol* **156**, 373-382.
- Spillantini, M.G., and Goedert, M. (1998). Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* **21**, 428-433.
- Spillantini, M.G., Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A., and Ghetti, B. (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7737-7741.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* **156**, 1051-1063.
- Stenmark, H., Aasland, R., Toh, B.H., and D'Arrigo, A. (1996). Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem* **271**, 24048-24054.
- Stenmark, H., Parton, R.G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* **13**, 1287-1296.
- Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O., and Zerial, M. (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* **83**, 423-432.
- Stoothoff, W.H., and Johnson, G.V. (2005). Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta* **1739**, 280-297.
- Strom, M., Vollmer, P., Tan, T.J., and Gallwitz, D. (1993). A yeast GTPase-activating protein that interacts specifically with a member of the Ypt/Rab family. *Nature* **361**, 736-739.
- Suter, D.M., and Forscher, P. (2000). Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol* **44**, 97-113.
- Takei, Y., Teng, J., Harada, A., and Hirokawa, N. (2000). Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol* **150**, 989-1000.
- Terry, R.D. (1996). The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 1023-1025.
- Terzyan, S., Zhu, G., Li, G., and Zhang, X.C. (2004). Refinement of the structure of human Rab5a GTPase domain at 1.05 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 54-60.
- Thacker, E., Kearns, B., Chapman, C., Hammond, J., Howell, A., and Theibert, A. (2004). The arf6 GAP centaurin alpha-1 is a neuronal actin-binding protein which

also functions via GAP-independent activity to regulate the actin cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* 83, 541-554.

Torres, V.A., Mielgo, A., Barila, D., Anderson, D.H., and Stupack, D. (2008). Caspase 8 promotes peripheral localization and activation of Rab5. *J Biol Chem* 283, 36280-36289.

Trahey, M., and McCormick, F. (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238, 542-545.

Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1994). Paired helical filament tau in Alzheimer's disease. The kinase connection. *Am J Pathol* 144, 449-453.

Tucker, K.L., Meyer, M., and Barde, Y.A. (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci* 4, 29-37.

Ullrich, O., Horiuchi, H., Bucci, C., and Zerial, M. (1994). Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* 368, 157-160.

Ulrich, F., Krieg, M., Schotz, E.M., Link, V., Castanon, I., Schnabel, V., Taubenberger, A., Mueller, D., Puech, P.H., and Heisenberg, C.P. (2005). Wnt11 functions in gastrulation by controlling cell cohesion through Rab5c and E-cadherin. *Dev Cell* 9, 555-564.

Utton, M.A., Noble, W.J., Hill, J.E., Anderton, B.H., and Hanger, D.P. (2005). Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein. *J Cell Sci* 118, 4645-4654.

Vale, R.D., Reese, T.S., and Sheetz, M.P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42, 39-50.

Valsdottir, R., Hashimoto, H., Ashman, K., Koda, T., Storrie, B., and Nilsson, T. (2001). Identification of rabaptin-5, rabex-5, and GM130 as putative effectors of rab33b, a regulator of retrograde traffic between the Golgi apparatus and ER. *FEBS Lett* 508, 201-209.

van der Blik, A.M. (1999). Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol* 9, 96-102.

van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B., and Mellman, I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70, 729-740.

Venkateswarlu, K., Brandom, K.G., and Lawrence, J.L. (2004). Centaurin-alpha1 is an in vivo phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent GTPase-activating protein for ARF6 that is involved in actin cytoskeleton organization. *J Biol Chem* 279, 6205-6208.

Vershinin, M., Carter, B.C., Razafsky, D.S., King, S.J., and Gross, S.P. (2007). Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 87-92.

Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.

Viereck, C., Tucker, R.P., Binder, L.I., and Matus, A. (1988). Phylogenetic conservation of brain microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Neuroscience* 26, 893-904.

Vitale, G., Rybin, V., Christoforidis, S., Thornqvist, P., McCaffrey, M., Stenmark, H., and Zerial, M. (1998). Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5. *EMBO J* 17, 1941-1951.

Vonderheit, A., and Helenius, A. (2005). Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol* 3, e233.

Wang, L.H., Sudhof, T.C., and Anderson, R.G. (1995). The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin. *J Biol Chem* 270, 10079-10083.

Watanabe, A., Hasegawa, M., Suzuki, M., Takio, K., Morishima-Kawashima, M., Titani, K., Arai, T., Kosik, K.S., and Ihara, Y. (1993). In vivo phosphorylation sites in fetal and adult rat tau. *J Biol Chem* 268, 25712-25717.

Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1858-1862.

Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-846.

Wilson, J.D., Liu, Y., Bentivoglio, C.M., and Barlowe, C. (2006). Sel1p/Ubx2p participates in a distinct Cdc48p-dependent endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Traffic* 7, 1213-1223.

Wilson, J.M., de Hoop, M., Zorzi, N., Toh, B.H., Dotti, C.G., and Parton, R.G. (2000). EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Mol Biol Cell* 11, 2657-2671.

Wischik, C.M., Novak, M., Thogersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., and Klug, A. (1988). Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4506-4510.

Witman, G.B., Cleveland, D.W., Weingarten, M.D., and Kirschner, M.W. (1976). Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 4070-4074.

Xiao, G.H., Shoarinejad, F., Jin, F., Golemis, E.A., and Yeung, R.S. (1997). The tuberous sclerosis 2 gene product, tuberin, functions as a Rab5 GTPase activating protein (GAP) in modulating endocytosis. *J Biol Chem* 272, 6097-6100.

Xu, Z., Marszalek, J.R., Lee, M.K., Wong, P.C., Folmer, J., Crawford, T.O., Hsieh, S.T., Griffin, J.W., and Cleveland, D.W. (1996). Subunit composition of neurofilaments specifies axonal diameter. *J Cell Biol* 133, 1061-1069.

Yang, L.S., and Ksiezak-Reding, H. (1995). Calpain-induced proteolysis of normal human tau and tau associated with paired helical filaments. *Eur J Biochem* 233, 9-17.

Ye, H., Kuruvilla, R., Zweifel, L.S., and Ginty, D.D. (2003). Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron* 39, 57-68.

Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K., and Nixon, R.A. (2008). Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J Neurosci* 28, 1682-1687.

Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 107-117.

Zhang, B., Ganetzky, B., Bellen, H.J., and Murthy, V.N. (1999). Tailoring uniform coats for synaptic vesicles during endocytosis. *Neuron* 23, 419-422.

Zhang, Y., Moheban, D.B., Conway, B.R., Bhattacharyya, A., and Segal, R.A. (2000). Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci* 20, 5671-5678.

Zhu, G., Liu, J., Terzyan, S., Zhai, P., Li, G., and Zhang, X.C. (2003). High resolution crystal structures of human Rab5a and five mutants with substitutions in the catalytically important phosphate-binding loop. *J Biol Chem* 278, 2452-2460.
Zhu, G., Zhai, P., Liu, J., Terzyan, S., Li, G., and Zhang, X.C. (2004). Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis. *Nat Struct Mol Biol* 11, 975-983.